

**ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Κ. Βαμβακόπουλος**

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΛΙΑΣ Θ. ΠΛΑΚΟΚΕΦΑΛΟΣ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ, Μ.Α.**

**ΛΑΡΙΣΑ 2002**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7786/2  
Ημερ. Εισ.: 18/3/2013  
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ  
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ  
616.203 019  
ΠΛΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000112985



## ► ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Σελίδα

Περιεχόμενα	3
Συντμήσεις	4
Πρόλογος	5
Γενικό μέρος	6
Εισαγωγή	
1. Βιολογία, κύκλος ζωής και επιδημιολογία των ιών της γρίπης	7
2. Κλινικές εκδηλώσεις της γρίπης	17
3. Γενετική μεταβλητότητα των ιών της γρίπης A (H3N2)	20
4. Εργαστηριακοί μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ιών της γρίπης	23
Εικόνες, πίνακες, διαγράμματα	30
Σκοπός της μελέτης	40
Υλικά και Μέθοδοι	42
Αποτελέσματα	45
Συζήτηση	61
Βιβλιογραφία	67
Ειδικό μέρος	84

► **Συντμήσεις:** Αγγλικοί όροι

**Ala:** alanine, αλανίνη

**cDNA:** complemetary DNA, συμπληρωματικό DNA

**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική μέθοδος

**Glu:** glutamic acid, γλουταμινικό οξύ

**HA:** haemagglutination, αιμοσυγκόλληση

**HAI:** haemmagglutination-inhibition, αναστολή της αιμοσυγκόλλησης

**Leu:** leucine, λευκίνη

**MDCK:** Mardin-Darby canine kidney, κυτταρική σειρά νεφρού σκύλου

**PBS:** Phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων

**PCR:** polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

**RBS:** receptor-binding site, σημείο επαφής του κυτταρικού υποδοχέα

**RFLP:** restriction fragment length polymorphism, ανάλυση πολυμορφισμού μήκους

με ένζυμα περιορισμού

**RT:** reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή

**SSCP:** single-strand conformation polymorphism, πολυμορφισμός μονόκλωνου

DNA

**Val:** valine, βαλίνη

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Παραδόξως, η γρίπη αν και είναι μια πολύ κοινή ασθένεια, οι πιο πολλοί απο εμάς έχουμε νοσήσει απ' αυτήν, προκαλεί φόβο, διότι η μνήμη της Ισπανικής πανδημίας γρίπης του 1918, που προκάλεσε 30 περίπου εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, δεν παύει να μας υπενθυμίζει την έντονη νοσηρότητά της που μπορεί να προσλάβει ανεξέλεγκτες διαστάσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρ'όλες τις προόδους της έρευνας στον τομέα της πρόληψης και θεραπείας, απο την πρώτη απομόνωση του ανθρώπινου ιού γρίπης το 1933, την ανάπτυξη του πρώτου αντιγριπικού εμβολίου το 1945 και των αντι-ικών ουσιών αμαδαντίνη την δεκαετία του 1960 και ριμανταδίνη έναντι της γρίπης Α αργότερα, η εξάλειψη της νόσου παραμένει ακόμη μία ανεκπλήρωτη ανθρώπινη προσδοκία.

Η συνεχής εξέλιξη των ιών της γρίπης επιβάλλει συνεχή αναθεώρηση της σύνθεσης του αντιγριπικού εμβολίου. Λόγω της ύπαρξης 'αποθήκης' ιών γρίπης Α σε διάφορα ζώα και ειδικά στα πτηνά, απ' τα οποία ιοί γρίπης με νέο υπότυπο μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο πληθυσμό (όπως έγινε στο τέλος του 1997 στο Hong Kong με την εμφάνιση περιστατικών μόλυνσης ανθρώπων με ιό γρίπης πτηνών Α (H5N1)), η απειλή μιας επικείμενης πανδημίας παραμένει δυνατή. Η γρίπη ως οξεία επιδημική νόσος του αναπνευστικού συστήματος είναι μια απο τις πιο σημαντικές αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Στην αυγή της τρίτης χιλιετίας, ο έλεγχος της γρίπης με την βοήθεια σύγχρονων εργαστηριακών μεθόδων διάγνωσης, αποτελεί μια πρόκληση για την δημόσια υγεία. Η παρούσα διατριβή επιδιώκει να συμβάλει ουσιαστικά στον τομέα αυτόν και ειδικά σε εθνικό επίπεδο.

## ► ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ► ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Βιολογία, κύκλος ζωής και επιδημιολογία των ιών της γρίπης

Οι ιοί της γρίπης είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας της γρίπης. Ανήκουν στην κλάση των Mononegavirales (ιοί με αρνητικής πολικότητας RNA), στην υπερκογένεια Myxoviridae, στην οικογένεια Orthomyxoviridae στα γένη Influenzavirus A, Influenzavirus B και Influenzavirus C και στα είδη: Influenza Virus A, Influenza Virus B και Influenza Virus C (Πίνακας 1). Βάσει διαφορών στα αντιγόνα της νουκλεοπρωτεΐνης και της πρωτεΐνης του υποστρώματος, οι ιοί της γρίπης διακρίνονται σε τρεις αντιγονικούς τύπους, τον A, τον B και τον C (1, 2). Η πρώτη απομόνωση ιού γρίπης από τον άνθρωπο έγινε το 1933 από τους Smith, Andrews και Laidlaw, και ονομάστηκε τύπος A, ενώ το 1940 απομονώθηκε, από την ίδια ομάδα, ο ιός γρίπης τύπου B (9, 10, 11, 58). Το 1947, ο Taylor απομόνωσε τον ιό γρίπης τύπου C (14). Οι τύποι A και B είναι υπεύθυνοι για τις ετήσιες επιδημίες γρίπης στον άνθρωπο. Ο τύπος A είναι ο πλέον μολυσματικός, διακρίνεται σε υπότυπους και συνδέεται με όλες τις μέχρι σήμερα πανδημίες γρίπης (8, 109). Όλοι οι υπότυποι έχουν κοινή νουκλεοπρωτεΐνη και πρωτεΐνη υποστρώματος, ενώ διαφέρουν στην σύνθεση των αντιγόνων της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (NA). Εως σήμερα, είναι γνωστοί 15 υπότυποι HA και 9 υπότυποι NA. Όλοι οι υπότυποι και συνδυασμοί αυτών υπάρχουν στα υδρόβια πτηνά, ενώ στον άνθρωπο κυκλοφορούν ή κυκλοφόρησαν οι υπότυποι H1N1, H2N2 και H3N2. Η ονοματολογία των στελεχών γρίπης παρουσιάζεται στον πίνακα 2.



Ιστορικά, ο υπότυπος H1N1 που προκάλεσε την ισπανική πανδημία του 1918, αντικαταστάθηκε από τον υπότυπο H2N2 το 1957, ο αιτιολογικός παράγοντας της Ασιατικής γρίπης. Το 1968 εμφανίστηκε ο H3N2, αντικαταστώντας τον H2N2 και προκαλώντας την πανδημία του Hong Kong. Ο H1N1 επανεμφανίστηκε το 1977 σε μορφή ήπιας πανδημίας. Από το 1977 έως σήμερα, ο υπότυπος Α (H1N1) κυκλοφορεί ταυτόχρονα, με τον Α (H3N2) και τον τύπο Β (6, 31).

Το γένωμα των ιών της γρίπης αποτελείται από γραμμικά, τεμαχισμένα, μονόκλινα τμήματα RNA αρνητικής πολικότητας (-ss RNA). Συγκεκριμένα, οι τύποι Α και Β περιέχουν οχτώ (8) τμήματα ενώ ο τύπος C, επτά (7). Τα τμήματα RNA των τύπων Α και Β είναι τα εξής: 1) πολυμεράση ή RNA μεταγραφάση, η οποία είναι σύμπλοκος εκ των 1) PA (όξινη πολυμεράση), 2) PB1 (βασική πολυμεράση 1) και 3) PB2 (βασική πολυμεράση 2), 4) η αιμοσυγκολλητίνη (HA), επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την προσήλωση του ιού, 5) η νευραμινιδάση (NA), επιφανειακή πρωτεΐνη με ενζυμική δράση, 6) η νουκλεοπρωτεΐνη (NP), εσωτερική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το RNA και την πολυμεράση, 7) οι πρωτεΐνες του υποστρώματος (M1 και M2) και 8) τις μη-δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2. Ο τύπος C περιέχει το αντιγόνο HE, το οποίο έχει δράση ανάλογη της HA (13, 20, 22, 109). Η γρίπη C διαφέρει στο ότι δεν αποτελείται από τρεις μονάδες αλλά από μία με το ενεργό της κέντρο να αναγνωρίζει έναν άλλο τύπο νευραμινικού οξέος (το N-ακετύλο-9-Ο-ακετυλονευραμινικό οξύ). Αυτό μπορεί να εξηγεί τη χαμηλή παθογένεια του ιού C (21).

Ο όρος 'μυξοϊός' χρησιμοποιήθηκε από το 1955 για να δηλώσει μια ομάδα ελυτροφόρων, σφαιροειδών RNA-ιών που σχετίζονται με τις βλεννίνες ή τις

μουκίνες. Ο ιός της γρίπης είναι RNA ιός που περιβάλλεται απο μανδύα και εμφανίζει γενικά σφαιρικό, σπειροειδές (50-120nm διάμετρος) αλλά και μερικές φορές ραβδοειδές σχήμα (με πάνω απο 3000nm μήκος). Η επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη HA κωδικοποιείται απο το 4<sup>ο</sup> τμήμα του RNA των τύπων A και B και η λειτουργία της είναι να συνδέεται με τους ξενιστικούς κυτταρικούς υποδοχείς που περιέχουν σιαλικό οξύ (N-ακέτυλονευραμινικό οξύ) για τη σύντηξη του μανδύα του ιού με τις ξενιστικές κυτταρικές μεμβράνες (3, 4, 12). Μια άλλη ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής είναι η αντιγονική ποικιλία που παρουσιάζει για να διαφεύγει απο την πίεση της ανοσολογικής αντίδρασης (15). Η HA είναι ομοτριμερές 135 A, έχει μορφή γόμφου με μια κεφαλή στην εξωτερική πλευρά του μανδύα και ένα διαμεμβρανικό μίσχο. Η μεταφραστική πολυπετιδική αλυσίδα HA0 κόβεται πρωτεολυτικά απο ξενιστικά ένζυμα σε δύο υπομονάδες, την HA1 και την HA2, που συνδέονται με έναν δισουλφικό δεσμό. Το κόψιμο αυτό είναι απαραίτητο για την πρόκληση της μόλυνσης απο τον ιό (7, 51). Η κεφαλή αποτελείται απο τις HA1 υπομονάδες στις οποίες βρίσκεται και το ενεργό κέντρο για τη δέσμευση του σιαλικού οξέος. Ο μίσχος σχηματίζεται απο την HA2 και ένα μέρος της HA1. Η αιμοσυγκολλητίνη μεταλλάσσεται σε υψηλούς ρυθμούς με εξαίρεση του ενεργού κέντρου της HA1 (100). Η νευραμινιδάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του μανδύα του ιού και η λειτουργία της είναι η αποκοπή των ειδικών τύπων νευραμινικού οξέος απο τις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Η NA είναι ένα ομοτετραμερές 60 A σύμπλοκο και δεν είναι διασπαρμένη τυχαία στο μανδύα αλλά εντοπίζεται σε κάποιες μικρές περιοχές συγκεντρωμένη (5).

Η μεγάλη, και ορισμένες φορές, ταχεία εξάπλωση του ιού της γρίπης οφείλεται ιδιαίτερα στον κύκλο ζωής του. Η μεταφορά του μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού είναι πολύ εύκολη, ενώ ο χαρακτηριστικά βραχύς πολλαπλασιασμός του, τον βοηθά να αποκτά ο πλυθυσμός του ιού, γρήγορα, μεγάλες διαστάσεις. Ο καλύτερα μελετημένος κύκλος ζωής, είναι αυτός του τύπου Α, που είναι όμοιος με αυτόν του τύπου Β (Διάγραμμα 1). Ο κύκλος ζωής του τύπου C παρουσιάζει πολύ μικρές διαφορές στις λεπτομέρειες του, όχι όμως στο γενικότερο πλάνο του κύκλου του (24). Η μεταφορά των σωματιδίων του ιού της γρίπης γίνεται κυρίως μέσω του αέρα, με τη βοήθεια ενός απλού φτερνίσματος από έναν μολυσμένο οργανισμό. Τα σωματίδια του ιού κυκλοφορούν στον αέρα μέσα σε σταγονίδια που προέρχονται από τα βιολογικά υγρά της αναπνευστικής οδού του οργανισμού (18). Οι ιοί της γρίπης πολλαπλασιάζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Ο τύπος Α μολύνει τα κύτταρα του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, ενώ οι τύποι Β και C, συνήθως μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του ανώτερου αναπνευστικού. Ο τύπος Α μολύνει εκτός από τον άνθρωπο, πολλά είδη πτηνών κυρίως υδρόβια, και ορισμένα θηλαστικά όπως το χοίρο, το άλογο και την φάλαινα. Ο τύπος Α είναι ο πλέον διαδεδομένος και μολυσματικός, ενώ ο τύπος Β μολύνει μόνο τον άνθρωπο (πίνακας 3). Η επιδημιολογία του τύπου C δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, λόγω των υποκλινικών συμπτωμάτων που παρουσιάζει αυτός ο τύπος του ιού. Από τους τρεις τύπους της γρίπης, ο τύπος C θα μπορούσε να ταξινομηθεί και ως ξεχωριστό γένος, γιατί έχει αρκετές διαφορές έναντι των άλλων δύο τύπων τόσο σε μορφολογικούς όσο και γενετικούς χαρακτήρες (2). Η συνεχής εξέλιξη του ιού της γρίπης και ειδικά των αντιγόνων της αιμοσυγκολλητίνης και της νευραμινιδάσης, είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο των ιών αυτών.

**Μοριακοί μηχανισμοί αντιγονικής εκτροπής και υπεκφυγής:** Ο ιός της γρίπης είναι ένας ssRNA ιός, στον οποίο παρατηρούνται συνεχώς νέοι υπότυποι που σχετίζονται με αναδιοργάνωση του ιικού γονιδιώματος, εκτεταμένη ή μη. Ο τύπος A μπορεί να υποστεί δύο ειδών ανασυνδυασμούς του γονιδιώματος του, την αντιγονική εκτροπή, κατά την οποία συμβαίνει τοπική μετάλλαξη μιας πρωτεΐνης, ή γίνεται μεταφορά από τον ξενιστή στον ιό ολόκληρου τμήματος RNA και την αντιγονική υπεκφυγή, κατά την οποία γίνεται μεταφορά γενετικού υλικού από τον έναν υπότυπο στον άλλο, με αποτέλεσμα τον ριζικό ανασυνδυασμό του ιικού γονιδιώματος. Τα στελέχη B και C υφίστανται μόνο αντιγονική εκτροπή. Γενικά, οι ιοί της γρίπης εκμεταλλεύονται όλους τους γνωστούς μηχανισμούς γενετικής ποικιλίας για να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους. Ξεχωριστά στοιχεία των RNA ιών περιλαμβάνουν υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης, μεγάλη απόδοση ανά κύκλο και μικρό χρόνο αντιγραφής. Σαν συνέπεια οι RNA ιοί αναπαράγονται ως πολύπλοκοι και δυναμικοί πληθυσμοί που ονομάζονται υπότυποι. Οι ρυθμοί μετάλλαξης σε ορισμένες γενετικές θέσεις επηρεάζονται από τη σύσταση της αλληλουχίας του RNA και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η εξέλιξη των υποτύπων εξαρτάται πολύ από το μέγεθος του πληθυσμού που εμπλέκεται στις μολύνσεις, αφού ένας μεγαλύτερος πληθυσμός οδηγεί σε γρηγορότερη προσαρμογή στις εκάστοτε συνθήκες. Επιδημιολογικές λειτουργικές και δομικές μελέτες προτείνουν πως οι RNA ιοί μπορούν να αντέξουν περιορισμένους τύπους και αριθμούς μεταλλαγών κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σημείου της εξέλιξής τους. Η αντιγονική εκτροπή που εμφανίζεται σε όλους τους τύπους προκαλείται από αλλαγή ή πρόσθεση βάσεων σε ένα προυπάρχον ιικό μόριο RNA. Σε αυτή την περίπτωση γενετικής ποικιλίας παράγονται ανασυνδυασμένα μόρια RNA, με αποτέλεσμα να παράγονται πρωτεΐνες με τροποποιημένα χαρακτηριστικά, τουλάχιστο όσον αφορά το ενεργό τους κέντρο

και τους επιτόπους των αντισωμάτων. Με την αλλαγή της σύστασης των επιτόπων μερικές φορές τα αντισώματα των κυττάρων μνήμης αναγνωρίζουν δύσκολα ή και καθόλου τις πρωτεΐνες-αντιγόνα. Αποτέλεσμα είναι ο οργανισμός-ξενιστής να χρειάζεται μεγάλο χρονικό διάστημα για την παραγωγή των κατάλληλων αντισωμάτων και ο ιός να έχει τα περιθώρια να αναπτύξει ένα μεγάλο πληθυσμό, που θα του εξασφαλίσει την επιβίωση. Το μεγαλύτερο λοιπόν ενδιαφέρον στις μεταλλάξεις του ιού εστιάζεται κυρίως στις αντιγονικές πρωτεΐνες, που είναι η HA και η NA. Η αντιγονική υπεκφυγή ονομάζεται και ομόλογος ανασυνδυασμός του ιικού γονιδιώματος και στηρίζεται κυρίως στο γεγονός ότι ο ιός της γρίπης έχει το γενετικό του υλικό τμηματοποιημένο. Κατά την προσβολή ενός κυττάρου από δύο στελέχη του ιού δημιουργείται μια δεξαμενή ιικών RNA στον πυρήνα. Όταν οι ιικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες ωριμάζουν τα ιικά RNA συνδιάζονται για να σχηματίσουν οχτάδες. Η περίπτωση που ενδιαφέρει περισσότερο από την σκοπιά της δημόσιας υγείας είναι η τυχαία ανακατανομή των HA και NA τμημάτων που δίνουν τις αντιγονικές πρωτεΐνες του ιού. Οι νέοι ιοί που παράγονται αποτελούν τους υποτύπους του τύπου A που η συνεχής εναλλαγή τους προσφέρει έναν μηχανισμό ελιγμού έναντι των αντισωμάτων. Η επιδημιολογική επιτυχία της γρίπης οφείλεται κυρίως σε δύο είδη αντιγονικής ποικιλομορφίας στα εξωτερικά αντιγόνα της αιμοσυγκολλητίνης και της νευραμινιδάσης. Τέτοιες αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα 'νέα' στελέχη του ιού να αναδύονται έναντι των οποίων δεν υπάρχει ανοσία στον πληθυσμό. Το πρώτο είδος αντιγονικής μεταβλητότητας είναι η ελλάσων μεταβολή (antigenic drift). Αυτό συμβαίνει και στο τύπο A και στον τύπο B της γρίπης και οφείλεται σε συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων, κυρίως στο γονίδιο της αιμοσυγκολλητίνης και ειδικά στις αντιγονικές θέσεις A έως E. Αυτές οι μεταλλάξεις συνεισφέρουν στην συνολική εξέλιξη των ιών της γρίπης. Ο δεύτερος τύπος αλλαγής

είναι η μείζων αντιγονική μεταβολή (antigenic shift). Αυτός ο τύπος αλλαγής είναι πιο δραστικός και παρουσιάζεται μόνο στον τύπο A, δημιουργώντας νέους υπότυπους (πίνακας 4). Η μείζων μεταβολή είναι αποτέλεσμα μικτής λοίμωξης ανθρώπινων και στελεχών γρίπης πτηνού ή χοίρου. Μέσω γενετικών ανασυνδυασμών επέρχεται ένας νέος υπότυπος γρίπης A (86, 103). Η ταχεία μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο τέτοιων στελεχών μπορεί να προκαλέσει πανδημία γρίπης. Οι ιοί της γρίπης έχουν την μοναδικότητα και την ικανότητα να προκαλούν συνεχώς ετήσιες επιδημίες και πιο σπάνια πανδημίες, η παγκόσμιες επιδημίες, με ταχεία μετάδοση ανάμεσα στον πληθυσμό. Το μέγεθος και η επίπτωση των επιδημιών είναι συνδυασμός της μολυσματικής ικανότητας η του μέγεθους της αντιγονικής αλλαγής του ιού και της υπάρχουσας πραστατευτικής ανοσίας στον πληθυσμό. Επιδημίες γρίπης ξεκινούν μάλλον απότομα, κορυφώνονται εντός δύο η τριών εβδομάδων και διαρκούν πέντε με έξι εβδομάδες. Αναφορές αυξημένων εμπύρετων αναπνευστικών περιστατικών σε παιδιά, είναι συχνά η πρώτη ένδειξη μιας επιδημίας γρίπης (74). Ακολουθούν αυξημένα περιστατικά σε ενήλικες και το επόμενο στάδιο είναι αυξημένες εισαγωγές ασθενών με πνευμονία, επιδείνωση χρόνιων αποφρακτικών και πνευμονικών νόσων. Παρ'όλη την προσπάθεια να καταγράφονται τα περιστατικά γρίπης ετησίως σε πολλές χώρες, δεν είναι ακόμη κατανοητή η εποχιακή συμπεριφορά της γρίπης και η ικανότητα υπεκφυγής και προσαρμογής του ιού (29).

**Επιδημική γρίπη:** Μια επιδημία είναι ένα ξέπασμα της γρίπης περιορισμένο σε μία τοποθεσία, σε μία πόλη η χώρα. Οι επιδημίες του τύπου A του ιού ακολουθούν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο. Τέτοιες τοπικής έκτασης επιδημίες, ξεκινούν μάλλον



απότομα, κορυφώνονται εντός δύο η τριών εβδομάδων και διαρκούν πέντε με έξι εβδομάδες (17). Στις τροπικές χώρες η γρίπη μπορεί να απομονωθεί καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, αν και σε μερικές περιπτώσεις ακολουθεί τις αλλαγές των καιρικών προτύπων. Σε εύκρατα κλίματα έχει παρατηρηθεί ότι λαμβάνονται απομονωθέντα στελέχη του ιού πολλές εβδομάδες πριν το ξέσπασμα της επιδημίας. Σε μία τυπική επιδημία μετά την πρώτη απομόνωση του ιού ο αριθμός αυξάνει συνεχώς για μια περίοδο 2-3 εβδομάδων, κάτι το οποίο ακολουθείται από πολλά περιστατικά, που μοιάζουν με αυτά της γρίπης. Ο αριθμός των ιών στη συνέχεια πέφτει ταχέως για μία περίοδο 2-3 εβδομάδων. Πολύ λίγα στελέχη μπορούν να απομονωθούν στο ακόλουθο διάστημα. Μετά ξαφνικά και μυστηριωδώς οι ιοί της γρίπης δεν επανακάμπτουν για το υπόλοιπο του έτους. Σε μερικές περιοχές γρίπης αντί για ένα ξαφνικό ξέσπασμα έχουμε μία σταθερή παρουσία περιστατικών καθόλη τη διάρκεια των χειμερινών μηνών. Μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει μία αυξημένη διαφοροποίηση ανάλογα με τις γεωγραφικές και ηλικιακές διαφορές. Για παράδειγμα, όταν οι H1N1 ιοί επανεμφανίστηκαν στο τέλος του χειμώνα 1977-1978 μετά από απουσία 21 ετών, η δραστηριότητα του ιού περιορίστηκε δραστικά στις σχολικές ηλικίες. Αυτό συνέβη παρά το γεγονός ότι τα νεότερα παιδιά δεν είχαν αναπτύξει ανοσία και παρά το ότι οι περισσότεροι ενήλικες κατείχαν χαμηλούς τίτλους αντισωμάτων εναντίον του H1N1 ιού. Όταν ο ίδιος ο ιός ανιχνεύτηκε τον επόμενο χειμώνα παρατηρήθηκε πολύ λιγότερη δραστηριότητα στις σχολικές ηλικίες σε αντίθεση με την προηγούμενη επιδημία (74). Οι επιδημίες συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά τους χειμερινούς μήνες στο βόρειο ημισφαίριο. Πολύ σπάνια υπάρχει παρουσία των ιών σε άλλες εποχές μέσα στο έτος. Εάν ένα νέο στέλεχος με αξιοσημείωτο διαφορετικό αντιγονικό τύπο εμφανιστεί, τα ξεπάσματα εμφανίζονται νωρίς τον Οκτώβριο. Στο νότιο ημισφαίριο τα ξεπάσματα συμβαίνουν από τον Μάιο μέχρι τον Σεπτέμβριο και

συχνά αποτελούν ένδειξη του τύπου του ιού που θα πλήξει το βόρειο ημισφαίριο τον επόμενο χειμώνα. Σε μεγάλες χώρες, όπως οι Η.Π.Α. και η Αυστραλία, παρατηρούνται συχνά διαφορές στο χρόνο εκδήλωσης των επιδημιών. Κατά την διάρκεια των επιδημιών το συνήθες ποσοστό μολυσμένων ατόμων, κυμένεται μεταξύ 10 και 20%, αν και σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες το ποσοστό μπορεί να φτάσει στο 40 και 50%.

Για πολλά χρόνια πιστευόταν ότι κατά την διάρκεια μίας επιδημίας γρίπης, επικρατεί μόνο ένα στέλεχος του ιού, και ότι τα υπόλοιπα στελέχη περιορίζονται ή εξαφανίζονται. Ωστόσο πολύ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι δύο διαφορετικά στελέχη συγκεκριμένων υποτύπων, ακόμα και τύπων, μπορούν να συνυπάρχουν. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τα πρότυπα των επιδημιών αλλάζουν από έτος σε έτος με έναν ανεξήγητο τρόπο. Ο υπότυπος Α μπορεί να είναι κυρίαρχος στον ένα χρόνο, να μην ανιχνεύεται στον επόμενο, και να επανεμφανίζεται τον επόμενο χρόνο με μία υπερβολικά μεγάλη συχνότητα. Ανάλογα μπορεί να συμβεί με τον τύπο Β. Επίσης, τα στελέχη Β τείνουν να είναι πιο σταθερά στην αντιγονικότητά τους και για το λόγο αυτό κυριαρχούν για μεγαλύτερο αριθμό ετών. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι ένα κύμα μολύνσεων που συμβαίνει στο τελευταίο μισό μίας επιδημικής περιόδου, συχνά είναι αυτό που κυριαρχεί στην επιδημία του επόμενου έτους (92).

**Πανδημική γρίπη:** Οι πανδημίες γρίπης προκύπτουν από την ενεργοποίηση ενός νέου ιού, στον οποίο ο γενικός πληθυσμός δεν έχει αναπτύξει ανοσία και για το λόγο αυτό οι επιδημίες εξαπλώνονται παγκοσμίως (34). Η σχέση διαφορετικών υποτύπων



του τύπου Α με την πανδημία γρίπης, για τα περασμένα 88 χρόνια, παρουσιάζεται στον πίνακα 6. Οι πανδημίες του '57, '68 και '77 ξεκίνησαν από την ενδοχώρα της Κίνας και εξαπλώθηκαν ανατολικά και δυτικά πρώτα στη Σοβιετική Ένωση και ύστερα στη Δυτική Ευρώπη. Ο λόγος εξαιτίας του οποίου παρουσιάζεται η Κίνα σαν πηγή πανδημιών, είναι το ότι η συνύπαρξη γουρουνιών, πουλιών και ανθρώπων κάτω από την ίδια στέγη παρέχει τις δυνατότητες για μεγάλης έκτασης μεταλλάξεων (86).

Οι πιο ισχυρές πανδημίες ήταν αποτέλεσμα μεγάλων αλλαγών και στις δύο κύριες επιφανειακές πρωτεΐνες. Η πιο έντονη εξαίρεση συνέβη στην περίπτωση του ιού A/USSR/77/H1N1 ο οποίος δεν προκάλεσε πανδημία παρά τις εκτεταμένες αλλαγές και στις δύο γλυκοπρωτεΐνες (89). Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι ο γενικός πληθυσμός είχε αναπτύξει ανοσία κατά της προηγούμενης H1N1 περιόδου (1917-1957) (103). Τέλος το μεσοδιάστημα μεταξύ πανδημιών ποικίλει σε διάρκεια και παραμένει μη προβλέψιμο.

Γενικά στελέχη του τύπου Α σχετίζονται με μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με αυτά του τύπου Β. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι η συνολική θνησιμότητα μεταξύ των επιδημιών υπερβαίνει αυτή των πανδημιών (64).

## 2. Κλινικές εκδηλώσεις και επιπλοκές της γρίπης

Η γρίπη είναι οξεία εμπύρετη λοιμώδης επιδημική νόσος, που οφείλεται στους ιούς της γρίπης, μεταδίδεται από το αναπνευστικό και παρουσιάζει ταχεία εξάπλωση. Η κλασική γρίπη Α, που εμφανίζεται σε άτομα όλων των ηλικιών, χαρακτηρίζεται από απότομη έναρξη των συμπτωμάτων που παρουσιάζονται μετά από χρόνο επώασης 3-4 ημερών. Τα προσβεβλημένα άτομα μεταδίδουν την ασθένεια μια ημέρα πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων καθώς και για πέντε ημέρες ακόμη. Αρχικά, προεξάρχουν συστηματικές εκδηλώσεις της νόσου και κυρίως υψηλός πυρετός, ρίγος, γενική κόπωση, κεφαλαλγία, μυαλγία, αρθραλγία και έμετοι, που συνήθως διαρκούν τρεις ημέρες (23). Σε παιδιά μικρότερα των 5 ετών εμφανίζονται έμετοι, διάρροια, λαρυγγοτραχειίτιδα, βρογχίτιδα, βρογχιολίτιδα, φαρυγγίτιδα και σπανιότερα τραχηλική αδενίτιδα, ωτίτιδα σπασμοί και εξάνθημα. Αλλα συμπτώματα που μπορεί να συνυπάρχουν και συνήθως επιμένουν 3-4 ημέρες μετά την υποχώρηση του πυρετού είναι φαρυγγικό άλγος, βράγχος φωνής, ξηρός βήχας, ρινική απόφραξη, ζάλη, ερεθισμός των ματιών και ανορεξία. Σοβαρές επιπλοκές της νόσου είναι η πρωτοπαθής ιογενής πνευμονία, η δευτεροπαθής μικροβιακή πνευμονία και τα νευρολογικά σύνδρομα Reye και Guillain-Barre καθώς και εγκεφαλίτιδα (23, 27). Μετά από γρίπη έχουν παρατηρηθεί επίσης μυοσίτιδα, μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα. Η πρωτοπαθής ιογενής πνευμονία και η δευτεροπαθής μικροβιακή πνευμονία είναι οι πιο σοβαρές επιπλοκές της γρίπης και ακολουθούν η λαρυγγίτιδα και η παρόξυνση χρόνιας αποφρακτικής βρογχίτιδας. Η πρωτοπαθής ιογενής πνευμονία παρόλο που συσχετίστηκε πρόσφατα με τον ιό της γρίπης, το 1957-1958, υπήρξε αναμφισβήτητη η αιτία πολλών θανάτων κατά την πανδημία γρίπης το 1918 (29). Παρατηρείται συχνότερα σε άτομα με καρδιοαναπνευστικά προβλήματα και

κυρίως άτομα με ρευματική καρδίτιδα και στένωση της μιτροειδούς, σε έγκυους καθώς και σε νεαρά υγιή άτομα. Εμφανίζεται μετά τα τρία πρώτα 24ωρα της τυπικής εκδήλωσης της γρίπης με παράταση του υψηλού πυρετού, βήχα, δύσπνοια και κυάνωση. Η κλινική εξέταση καθώς και η ακτινογραφία θώρακος συνηγορούν για διάχυτη πνευμονική βλάβη και όχι πνευμονική πύκνωση δηλαδή εικόνα οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας. Τα αέρια αίματος δείχνουν υποξία, η χρώση Gram και οι καλλιέργειες πτυέλων είναι αρνητικά για παθογόνα μικρόβια, ενώ οι καλλιέργειες για ιούς συχνά είναι θετικές για ιό της γρίπης τύπου A (97). Οι ασθενείς αυτοί δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αντιβιοτικά. Σύνδρομο Guillain-Barre, εγκεφαλίτιδα και σύνδρομο Reye έχουν συσχετισθεί με τους ιούς της γρίπης. Το σύνδρομο Guillain-Barre (GBS), όπως και περιπτώσεις εγκάρσιας μυελίτιδας και εγκεφαλίτιδας έχουν περιγραφεί μετά νόσηση από γρίπη A, ενώ εγκεφαλίτιδα σε ενήλικες μετά από γρίπη B (30). Το σύνδρομο δημιουργεί προβλήματα στο νευρικό σύστημα και τελικά παράλυση. Η ανάρρωση είναι πλήρης η σχεδόν πλήρης στο 85% των περιπτώσεων. Η θνητότητα κυμαίνεται στο 6%. Η αιτία δημιουργίας του GBS είναι άγνωστη και εμφανίζεται με συχνότητα 10-20 περιπτώσεων το χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το σύνδρομο Reye περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1963. Προσβάλλει άτομα 2-16 ετών και συσχετίζεται κυρίως με τον ιό τύπου B και σπανιότερα με τον A, με ιούς coxsackie A και B και με τον ιό της ανεμοβλογιάς-έρπητα ζωστήρα. Χαρακτηρίζεται από ποικιλία νευρολογικών συμπτωμάτων όπως λήθαργο, παραλήρημα, διανοητική σύγχυση, σπασμούς και κώμα, από εμέτους και από ηπατομεγαλία χωρίς ίκτερο. Η γρίπη από ιό τύπου B παρουσιάζει παρόμοια, αλλά ηπιότερη κλινική εικόνα, σε νεαρά κυρίως άτομα, ενώ η γρίπη C είναι ακόμα ελαφρότερη και συχνά περνάει αδιάγνωστη. Οι πρωτεΐνες αιμοσυγκολλητίνη και νευραμινιδάση αποτελούν τους πρωτογενείς στόχους της ανοσολογικής απάντησης

του οργανισμού στην εισβολή του ιού της γρίπης. Τα αντισώματα έναντι της αιμοσυγκολλητίνης εξουδετερώνουν τη μολυσματικότητα του ιού και τα αντισώματα έναντι της νευραμινιδάσης τροποποιούν τη σοβαρότητα της ασθένειας. Οι ετήσιες επιδημίες, παγκοσμίως, είναι υπεύθυνες για υψηλούς δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας (17). Η κύρια μέθοδος πρόληψης έναντι στον ιό είναι ο εμβολιασμός. Τα εμβόλια της γρίπης δημιουργούν ανοσολογική απάντηση που είναι ειδική για το στέλεχος του ιού ως προς την αιμοσυγκολλητίνη. Το αντιγριπικό είναι τριδύναμο για να περιέχει όλους τους υπότυπους γρίπης που κυκλοφορούν. Η προστασία του ατόμου αρχίζει συνήθως δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό και διαρκεί 6 περίπου μήνες (19).

Τα άτομα που ανήκουν σε ομάδες με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών από γρίπη, όπως τα άνω των 65 ετών, άτομα με χρόνια νοσήματα του αναπνευστικού και κυκλοφορικού συστήματος παιδιά 6-18 μηνών και άτομα με χρόνια μεταβολικά νοσήματα και ανοσοκαταστολή, πρέπει να εμβολιάζονται κάθε χρόνο, στις αρχές Οκτωβρίου ή Νοεμβρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας και των υγειονομικών αρχών κάθε χώρας (25). Το τριδύναμο αντιγριπικό εμβόλιο περιέχει τα στελέχη του ιού που επικράτησαν στο βόρειο ή στο νότιο ημισφαίριο.

### 3. Γενετική μεταβλητότητα των ιών της γρίπης A (H3N2)

Οι τεχνικές της αιμοσυγκόλλησης και της αιμοπροσρόφησης, που περιγράφηκαν από τον Hirst το 1941, παραμένουν σημαντικές στην ανίχνευση ιών γρίπης και στην αντιγονική ταυτοποίηση της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (NA). Οι δύο αυτές τεχνικές βασίζονται στην προσκόλληση της HA του ιού σε υποδοχείς ολιγοσακχαριτών που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή, τα σιαλικά οξέα (SA), τα οποία ενώνονται με γλυκοπρωτείνες και γλυκολιπίδια της επιφάνειας του κυττάρου (3). Όλοι οι ιοί γρίπης τύπου A αναγνωρίζουν ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν τελικά SA σαν υποδοχείς. Η περιοχή του υποδοχέα (RBS) είναι πολύ συντηρημένη, ακόμη και ανάμεσα σε HA από διαφορετικούς υποτύπους ιών γρίπης πτηνών (78, 83). Η HA ιών γρίπης του ανθρώπου δείχνει προτίμηση σε SA τα οποία δεσμεύονται με γαλακτόζη μέσω δεσμών τύπου α<sub>2</sub>,6. Οι ιοί γρίπης πτηνών και αλόγων δεσμεύονται με δεσμούς τύπου α<sub>2</sub>,3 Gal-SA. Στην περίπτωση ιών H2 και H3, τα αμινοξέα στις θέσεις 226 και 228 της HA είναι υπεύθυνα για αυτήν την ειδικότητα. Η HA ιών γρίπης του ανθρώπου περιέχουν Leu και Ser στις θέσεις 226 και 228, ενώ η HA ιών γρίπης των πτηνών, Gln και Gly στις αντίστοιχες θέσεις. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι μια αλλαγή Leu σε Gln στην θέση 226, HA ιού ανθρώπου, μπορεί να τροποποιήσει την ειδικότητα από SAα<sub>2</sub>,6Gal σε SAα<sub>2</sub>,3Gal. Μια περαιτέρω αλλαγή, Ser σε Gly στην θέση 228, ενισχύει την ανωτέρω ειδικότητα. Αλλαγές στις θέσεις 145, 186 και 225 της HA, ιών H1 και H3, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ειδικότητα της HA προς τον κυτταρικό υποδοχέα.

Οι ιοί της γρίπης A(H3N2) καθώς και όλοι οι υπότυποι της γρίπης A μπορούν να απομονωθούν από διάφορα ζώα, συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου, του χοίρου, του αλόγου, θαλάσσιων θηλαστικών και άγριων υδρόβιων πτηνών. Από τα ανωτέρω

ζώα ξενιστές, τα άγρια υδρόβια πτηνά αποτελούν την κύρια αρχέγονο δεξαμενή ιών γρίπης τύπου Α. Στα υδρόβια πτηνά έχουν απομονωθεί όλοι οι υπότυποι ΗΑ (Η1-Η15).

Πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες του ιού Α έχουν αποκαλύψει ιικά γονίδια των οποίων η καταγωγή σχετίζεται με συγκεκριμένα είδη και έχουν αποδείξει ότι η επικράτηση της μεταφοράς των ιών της γρίπης μεταξύ των ειδών στηρίζεται αποκλειστικά σε ζωικά είδη (88). Τέλος, έχουν αποκαλύψει ότι τα υδρόβια πτηνά είναι η πηγή των ιών της γρίπης που προσβάλλουν και τα υπόλοιπα ζώα (77). Λεπτομερής μελέτη των πτηνών κατά την διάρκεια μιας επιδημίας γρίπης στα πουλικά στην Καλλιφόρνια έδειξε ότι πολλοί μη παθογόνοι ιοί τύπου Α μπορούσαν να απομονωθούν από αυτά (112). Εν συνεχεία, ιοί γρίπης απομονώθηκαν από άγρια πουλιά, πουλιά σε αιχμαλωσία, οικόσιτες χήνες, κοτόπουλα και γαλοπούλες, κάτι το οποίο αποκάλυψε ότι μη παθογόνα πτηναία στελέχη είναι πανταχού παρών ιδιαίτερα σε υδρόβια πτηνά. Επίσης ότι όλοι οι διαφορετικοί υπότυποι των ιών Α (Η1-Η15 και Ν1-Ν9) διαγιγνώσκονται στα υδρόβια πτηνά, ιδιαίτερα στα μεταναστευτικά είδη (109).

Οι ενδείξεις μιας επιδημίας γρίπης Α στα πτηνά ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το στέλεχος του ιού. Οι μολύνσεις που προκαλούνται από τα περισσότερα στελέχη είναι τελείως αντισυμπτωματικές, ωστόσο, λίγα στελέχη προκαλούν συστηματική μόλυνση που συνοδεύεται από διαταραχές του νευρικού συστήματος, κάτι το οποίο συνεπάγεται θάνατος εντός μίας εβδομάδος (στελέχη των Η5 και Η7 υποτύπων). Στις αγριόπαπιες, οι ιοί της γρίπης πολλαπλασιάζονται προνομιακά στο στρώμα κυττάρων που επενδύει την εντερική περιοχή, χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας και εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες στα κόπρανα. Αυτή η πληροφορία δείχνει ότι τα

υδρόβια πτηνά έχουν έναν πολύ αποτελεσματικό τρόπο να μεταφέρουν τους ιούς , μέσω των κοπράνων τους στα αποθέματα νερού (87). Κάτω απο πειραματικές συνθήκες, ιοί γρίπης Α των πτηνών δεν πολλαπλασιάζονται στον άνθρωπο ενώ κατά τον ίδιο τρόπο, στελέχη γρίπης Α του ανθρώπου δεν πολλαπλασιάζονται στα υδρόβια πτηνά. Στα υδρόβια πτηνά οι ιοί γρίπης συνυπάρχουν με τον ξενιστή στο πεπτικό του σύστημα και δεν προκαλούν συμπτώματα (62, 93, 101). Παρόμοιες μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός φραγμού για τους ιούς της γρίπης Α, μεταξύ αυτών των ξενιστών. Οι κύριες αιτίες της γενετικής μεταβλητότητας των ιών της γρίπης είναι η ανοσολογική πίεση του ξενιστή, οι ανασυνδυασμοί που συμβαίνουν λόγω του τεμαχισμένου γενώματος των ιών και σε λάθη της μεταγραφάσης (18, 23).

Οι ιοί που ευθύνονταν για τις πανδημίες γρίπης του 1957 και του 1968, ήταν ανασυνδυασμένοι ιοί ανθρώπου και πτηνών, γονίδια των οποίων εισήρθαν στον ανθρώπινο πληθυσμό, παραβιάζοντας τον συγκεκριμένο φραγμό (84). Η αναδιάταξη των γονιδίων HA πτηνού και ανθρώπου πιθανόν να έγινε σε έναν ενδιάμεσο οργανισμό όπως ο χοίρος (64). Η μελέτη των μηχανισμών ανάδυσης πανδημικών στελεχών γρίπης απαιτεί την κατανόηση της μοριακής βάσης του φραγμού των ξενιστών και ειδικότερα ο ρόλος της πρωτεΐνης του υποστρώματος (M1) στην εμφάνιση νέων υπότυπων (15). Η ειδικότητα της HA, ιών γρίπης Α, προς τον κυτταρικό υποδοχέα έχει συνδεθεί με την ιδιότητα τους να αιμοσυγκολλούν ερυθρά κύτταρα απο διάφορα είδη ζώων (87). Πολλαπλά περάσματα στελεχών γρίπης σε καλλιέργειες, όπως τα εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας κατά την διάρκεια επίβλεψης της γρίπης, επιφέρουν αλλαγές στην ειδικότητα αιμοσυγκόλλησης της HA (80, 81, 82). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένοι ιοί γρίπης Α (H3N2) του ανθρώπου είχαν χάσει την ικανότητα να αιμοσυγκολλούν ερυθρά κύτταρα όρνιθας (85, 107). Τέτοια φαινοτυπική αλλαγή συνήθως προέκυπτε κατόπιν πολλαπλών περασμάτων του ιού



σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και σε κυτταροκαλλιέργειες MDCK (108). Οι μεταλλάξεις που συνδέονταν με αυτές τις προσαρμοστικές αλλαγές βρίσκονται πάνω στο τμήμα HA1 της HA. Η σημασία αυτών των αλλαγών είναι ακόμη πιο σημαντική όταν έχει επίπτωση στην ετήσια επίβλεψη της γρίπης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (73). Βάσει μελετών, κατόπιν πολλαπλών περασμάτων του αρχικού κλινικού δείγματος σε αυγά η/και σε κυτταροκαλλιέργειες και σύγκριση των αλληλουχιών των αμινοξέων του αρχικού δείγματος με αυτό της καλλιέργειας, ο ίδιος ιός γρίπης εμφάνισε αλλαγές σε περιοχές της HA που ευθύνονται στην ικανότητα αιμοσυγκόλλησης, με αποτέλεσμα την μη ταυτοποίηση του στελέχους του ιού (42). Το παράδειγμα του στελέχους A (H5N1) στο Hong Kong το 1997 έδειξε την σημασία της γενετικής ανάλυσης της HA του ιού για να διαπιστωθεί η μολυσματική ικανότητα αυτών (84).

#### **4. Εργαστηριακοί μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης ιών γρίπης**

Είναι γνωστό ότι η γρίπη όπως και άλλες ιογενής λοιμώξεις του αναπνευστικού έχουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα, καθιστώντας έτσι την κλινική διακριση μεταξύ τους δύσκολη (28). Βασική προϋπόθεση για την εργαστηριακή διάγνωση της γρίπης είναι η λήψη κατάλληλου δείγματος στον κατάλληλο χρόνο και με τον κατάλληλο τρόπο (119). Χρησιμοποιούνται δύο είδη δειγμάτων: 1) Εκπλύματα φάρυγγα με υλικό που δίνεται απο το εργαστήριο ή ρινοφαρυγγικά εκπλύματα που λαμβάνονται με ειδική συσκευή προσαρμοσμένη σε αντλία κενού η ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που λαμβάνονται με βαμβακοφόρο στυλέο και τοποθετούνται αμέσως σε υλικό μεταφοράς ιών. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και



απομόνωση ιών γρίπης και 2) Δύο δείγματα ορού αίματος, ένα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και ένα δύο εβδομάδες αργότερα, στην φάση της ανάρρωσης. Η κλινική διάγνωση της γρίπης μπορεί να επιβεβαιωθεί με την άμεση εξέταση των κλινικών δειγμάτων, με την απομόνωση του υπεύθυνου ιού και με τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων έναντι του ιού στον ορό αίματος των ασθενών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ιών της γρίπης είναι οι εξής:

**Ανοσοφθορισμός:** χρησιμοποιείται από το 1956 σαν άμεση και έμμεση δοκιμασία για την εντόπιση στα κλινικά δείγματα ειδικών αντιγόνων των ιών της γρίπης Α και Β με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά είναι σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική και όταν είναι μονοκλωνικά η ευαισθησία είναι ίση με 71%, η δε ειδικότητα 97%. **Ενζυμική ανοσοδοκιμή:** χρησιμοποιείται όπως και ο ανοσοφθορισμός μόνο που το αντίσωμα ανίχνευσης είναι σημασμένο με ένζυμο. Η ευαισθησία της μεθόδου φθάνει το 88% η δε ειδικότητα της το 100%. Τελευταία χρησιμοποιείται η άμεση ανοσοδοκιμή επί μεμβράνης για την ανίχνευση της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού γρίπης Α. Το αποτέλεσμα δίδεται σε λιγότερα από 15 λεπτά. **Φθοριοανοσοδοκιμή:** Το αντίσωμα ανιχνευτής είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα ο δε παραγόμενος φθορισμός μετράται σε ειδικό φθοριόμετρο. Η ευαισθησία φθάνει το 95%. **Υβριδισμός νουκλεϊνικού οξέος:** Το συμπληρωματικό DNA του RNA του ιού είναι σημασμένο με ραδιενεργό ή μη υλικό όπως η βιοτίνη, δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή πράξη. **Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR):** Η ανάπτυξη των δύο τελευταίων δεκαετιών στις μοριακές μεθόδους διαχείρισης του RNA και του DNA έχει παράσχει στους μοριακούς βιολόγους τη δυνατότητα να μελετούν τα ιικά γονιδιώματα λεπτομερειακά κάτι το οποίο ως τώρα δεν ήταν δυνατόν. Υπάρχουν πολλές μοριακές τεχνικές διαθέσιμες τώρα για την τυποποίηση και την υποτυποποίηση των ιών. Περιλαμβάνουν

πολυμορφισμό μήκους περιοριστικού θραύσματος (restriction fragment length polymorphism analysis), μέθοδο ανάλυσης δακτυλικών αποτυπωμάτων ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide fingerprint analysis), DNA ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (DNA enzyme immunoassay), ανάλυση προστασίας από RNAση (Rnase protection analysis) και αλληλούχιση νουκλεοτιδίων (nucleotide sequence analysis). Η RT-PCR εφαρμόζεται σε κλινικά δείγματα που περιέχουν το RNA του ιού οπότε με αντίστροφη μεταγραφή παίρνουμε το συμπληρωματικό DNA του ιού. Αυτό ενισχύεται με κατάλληλα οδηγά νουκλεοτίδια και ακολούθως το προϊόν ηλεκτοφορείται για τον διαχωρισμό των προϊόντων της PCR.

Στην περίπτωση όπου η χορήγηση αμαδαντίνης, ριμαδαντίνης ή άλλων αντι-ιικών ουσιών για την αντιμετώπιση της γρίπης επιβάλλεται, η έγκαιρη ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού είναι αναγκαία (60, 96). Επίσης, για την αιτιολογική επιβεβαίωση επιδημιών, απαιτείται η απομόνωση του ιού. Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ιών της γρίπης βασισμένοι σε ανοσολογικές και μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται με διαφορετικές ευαισθησίες και ειδικότητες. Η ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA) χρησιμοποιείται ευρέως στο κλινικό εργαστήριο καθώς και ο ανοσοφθορισμός (37, 38, 48). Οι τεχνικές αυτές παρέχουν ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα, έως 85% και 95% αντίστοιχα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη αυτής της ευαισθησίας είναι η παρουσία αντιγόνων στο κλινικό δείγμα, όπως είναι δυνατό κατόπιν καλλιέργειας του ιού. Ο τύπος δείγματος καθώς και η λήψη και συντήρηση του κλινικού δείγματος είναι βασικοί παράμετροι στην τελική ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού στο κλινικό δείγμα. Μέθοδοι ανίχνευσης βασισμένοι σε τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως ο υβριδισμός νουκλεϊκού οξέος, η PCR, η RT-PCR και παραλλαγές αυτής όπως η ποσοτική και η ημι-ποσοτική PCR, έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν ιό γρίπης σε δείγμα που μπορεί να είναι αρνητικό

με ανοσοενζυμικές μεθόδους η/και καλλιέργεια (40, 41, 42). Επίσης, είναι δυνατή η υποτυποποίηση, η διακρίβωση μικτών λοιμώξεων, και η ταυτόχρονη ταυτοποίηση διαφόρων τύπων και υποτύπων ιών γρίπης με την μέθοδο της πολλαπλής PCR (multiplex RT-PCR). Τα προϊόντα της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτη του ιού ή τμήματος αυτού με τις τεχνικές της εξακρίβωσης της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων (DNA sequencing), των RFLP και SSCP, καθώς και η μέθοδος PCR σε συνδυασμό με την ανοσοενζυμική δοκιμή (PCR-ELISA). Η ευαισθησία και η ειδικότητα που έχουν αναφερθεί για τις ανωτέρω μεθόδους πλησιάζουν το 100%, στο απ'ευθείας κλινικό δείγμα. Οι συνηθισμένες μέθοδοι διάγνωσης της γρίπης βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε εμβυόφορα αυγά όρνιθας ή σε κυταροκαλλιέργειες και στην μετέπειτα ταυτοποίηση του στελέχους του ιού με την μέθοδο αναστολής της αιμοσυγκόλλησης. Τα προβλήματα που παρουσιάζονται με αυτές τις μεθόδους αναφοράς είναι πρώτον ο χρόνος που απαιτείται (7-20 ημέρες για μια τελική διάγνωση) και δεύτερον η δυσκολία συντήρησης των κλινικών δειγμάτων κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διατηρηθεί η μολυσματική ικανότητα του ιού. Σαν αποτέλεσμα, εναλλακτικές μέθοδοι ταχείας διάγνωσης είναι απαραίτητες για να παρέχουν έγκαιρη θεραπεία και προφύλαξη έναντι της γρίπης με συγκεκριμένες αντι-ιικές ουσίες όπως η αμαδαντίνη και η ριμανταδίνη (για την γρίπη Α), και αναστολείς της δράσης της νευραμινιδάσης, όταν αυτά διατίθενται μέσα σε 48 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Επίσης, η έγκαιρη ταυτοποίηση ιών της γρίπης επιτρέπει την επιδημιολογική επίβλεψη της ασθένειας της γρίπης. Ανάμεσα στις διάφορες μεθόδους ανίχνευσης που προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, η ανίχνευση του RNA μέσω της PCR είναι η πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος, συγκρινόμενη με αυτή της καλλιέργειας. Με την ανάπτυξη αντι-ιικής θεραπείας, θα είναι απαραίτητο τα κλινικά εργαστήρια να χρησιμοποιούν

ταχείες διαγνωστικές μεθόδους. Καθώς η καλλιέργεια της γρίπης απαιτεί 4 ημέρες, δεν προσφέρεται για κάτι τέτοιο. Χρησιμοποιώντας καλά σχεδιασμένα πρωτόκολλα, η ανίχνευση ιών της γρίπης με PCR είναι διαθέσιμη για ειδικά εργαστήρια.

Αποτελέσματα από την φωλιασμένη (nested) PCR μπορούν να είναι διαθέσιμα σε 24 ώρες. Τα προϊόντα της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την περαιτέρω μελέτη της γενετικής μεταβλητότητας των ιών της γρίπης. Συγκεκριμένα, οι τεχνικές EIA-PCR, RFLP, SSCP και sequencing (εξακρίβωση της αλληλουχίας), παρέχουν την ικανότητα για την ταυτοποίηση, μοριακή ανάλυση και μοριακή επιδημιολογική μελέτη των ιών της γρίπης (43, 44, 45). Συμπερασματικά, η εφαρμογή της RT-PCR στην ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών της γρίπης σε κλινικά δείγματα, δίνει την ικανότητα της υποτυποποίησης και ανίχνευσης μικτών λοιμώξεων με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

**Εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων:** Ο πειραματικός προσδιορισμός της γραμμικής διάταξης των βάσεων σε ένα ιικό γονιδίωμα είναι ο βασικός τρόπος υποτυποποίησης. Η εύρεση αλληλουχίας του γονιδιώματος παρέχει τη δυνατότητα για διάκριση ακόμη και μεταξύ 'γονέα και αντιγόνου', εάν μία μετάλλαξη έχει συμβεί στη διαδικασία της αντιγραφής. Η εύρεση της αλληλουχίας γενικά απαιτεί χρόνο και πηγές και παρέχει έναν όγκο πληροφορίας που μπορεί να συγκρατηθεί στο ελάχιστο. Μόνο τα κομμάτια του γονιδιώματος που παρέχουν τον υπότυπο χρειάζεται να συγκριθούν, αλλά στην αρχή η πληροφορία αυτή μπορεί να μην είναι γνωστή. Η χρήση της μεθόδου PCR σε συνδυασμό με την εύρεση της αλληλουχίας έχουν οργανώσει πιο αποδοτικά τη μέθοδο έτσι ώστε, κανείς να παίρνει μια πλήρως αναλυμένη αλληλουχία από ένα μικρό (1kb) κομμάτι του ιικού γονιδιώματος εντός τριών ημερών μετά την κλινική απομόνωση. Φυσικά, όλα τα RNA γονιδιώματα

πρέπει να μετατρέπονται σε DNA πριν τη διαδικασία της εύρεσης αλληλουχίας. Έτσι ώστε η χρήση της RT-PCR να γίνεται εφικτή και να οδηγεί κατευθείαν σε ένα προϊόν ικανό να μελετηθεί ως προς την αλληλουχία (81).

Ειδικά για τους ιούς της γρίπης, μια πολύ πρόσφατη εφαρμογή της μεθόδου για το σκοπό του μοριακού χαρακτηρισμού είναι η περίπτωση της πτηναίας γρίπης A (H5N1) απομονωμένης από παιδί στο Hong Kong με θανατηφόρο ιό. Το απομονωθέν πάρθηκε από τραχειακό δείγμα. Τα γονίδια της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης αναπτύχθηκαν με RT-PCR και μελετήθηκαν ως προς την αλληλουχία τους για να επιβεβαιωθεί ο H5N1 γονότυπός τους. Αυτό αποκάλυψε την παρουσία μιας πολυβασικής αμινοξικής παρεμβολής πριν από το σημείο κοψίματος της θρυψίνης. Αυτή η παρεμβολή έχει προηγουμένως βρεθεί σε αυξημένης παθογένειας στελέχη πτηναίας γρίπης και πιστεύεται ότι βοηθάει την συστηματική διασπορά του ιού, αφήνοντας πρωτεάσες, παρόμοιες με την θρυψίνη, να κόβουν την HA σε HA1 και HA2 περιοχές.

Έχει περιγραφεί μια πρακτική εφαρμογή της μεθόδου, στην οποία εφαρμόστηκαν η μέθοδος της πολλαπλής αντίστροφης μεταγραφής και του πολλαπλού PCR για να διακριθούν τα HA γονίδια των ιών. Τα ειδικά για τον κάθε υπότυπο εκκενιτήρια μόρια στην παραπάνω μέθοδο, διαχώρισαν τα στελέχη σε ότι αφορά τον τύπο και τον υπότυπό τους, επειδή τα χρησιμοποιούμενα προϊόντα του τύπου A (H1 και H3), B (HA γονίδιο), και C (HA, εστεράση και γονίδιο HEF) σύντηξης ήταν διαφορετικού μεγέθους. Σε ακόλουθη HMA ανάλυση το ανεπτυγμένο προϊόν του κλινικού στελέχους αναμείχθηκε με αντίστοιχο προϊόν στελέχους αναφοράς και η προκειμένη κινητικότητα μετά από ηλεκτροφόρηση έδειξε την απόκλιση του κλινικού στελέχους. Αυτή η διαδικασία διαρκεί δύο ημέρες και επομένως πρόκειται για μία σύντομη και απλή μέθοδο, για την ταυτοποίηση κλινικών στελεχών του ιού.

**Ανάλυση προστασίας απο την RNAση:** Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Myers για τον σκοπό του προσδιορισμού της παρουσίας και των θέσεων των σημειακών μεταλλάξεων στο DNA. Η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση ενός συγκριτικά μικρού in vitro συνθετιμένου ραδιενεργού RNA δείγματος που μεταγράφεται απο γονιδιακό DNA άγριου τύπου από ένα σταθερό στέλεχος η τύπο στελέχους ενός οργανισμού. Στην αρχική μέθοδο το δείγμα υβριδοπήθηκε σε DNA από υπό εξέταση στελέχη πριν από την αφομοίωση του ετερόδιπλου μορίου με RNAση.

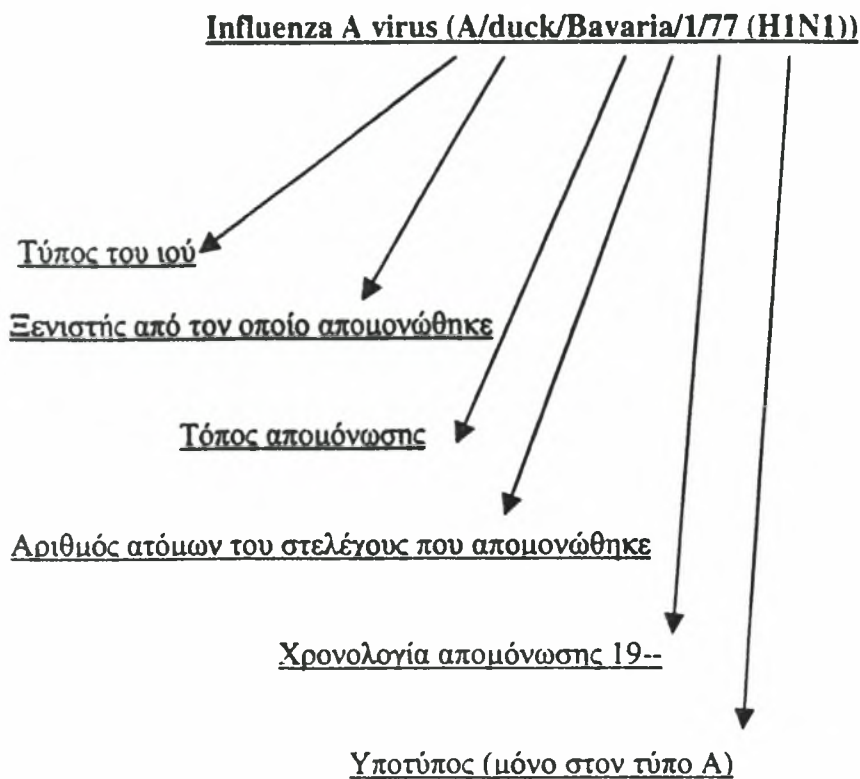
## ► Εικόνες, πίνακες και διαγράμματα







Τα στελέχη ονομάζονται σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν κατά την απομόνωσή τους.



Ο τύπος A αριθμεί περίπου 1194 απομονωμένα στελέχη από τα οποία τα 6 είναι υβριδικά και τα 299 μη προσδιορισμένα. Ο τύπος B αριθμεί 109 στελέχη και ο τύπος C 18\*. Η μεγάλη διαφορά στις τιμές οφείλεται στο ότι τον άνθρωπο απασχολούν οι τύποι A και B και κυρίως ο τύπος A λόγω της εμφάνισης μεγάλων πανδημιών. Ο τύπος C έχει μελετηθεί λιγότερο αφού αφορά ήπιες ή ασυμπτωματικές αναπνευστικές ασθένειες. Επίσης οι τύποι B και C εμφανίζουν αρκετά πιο αργή εξέλιξη σε σχέση με τον τύπο A.

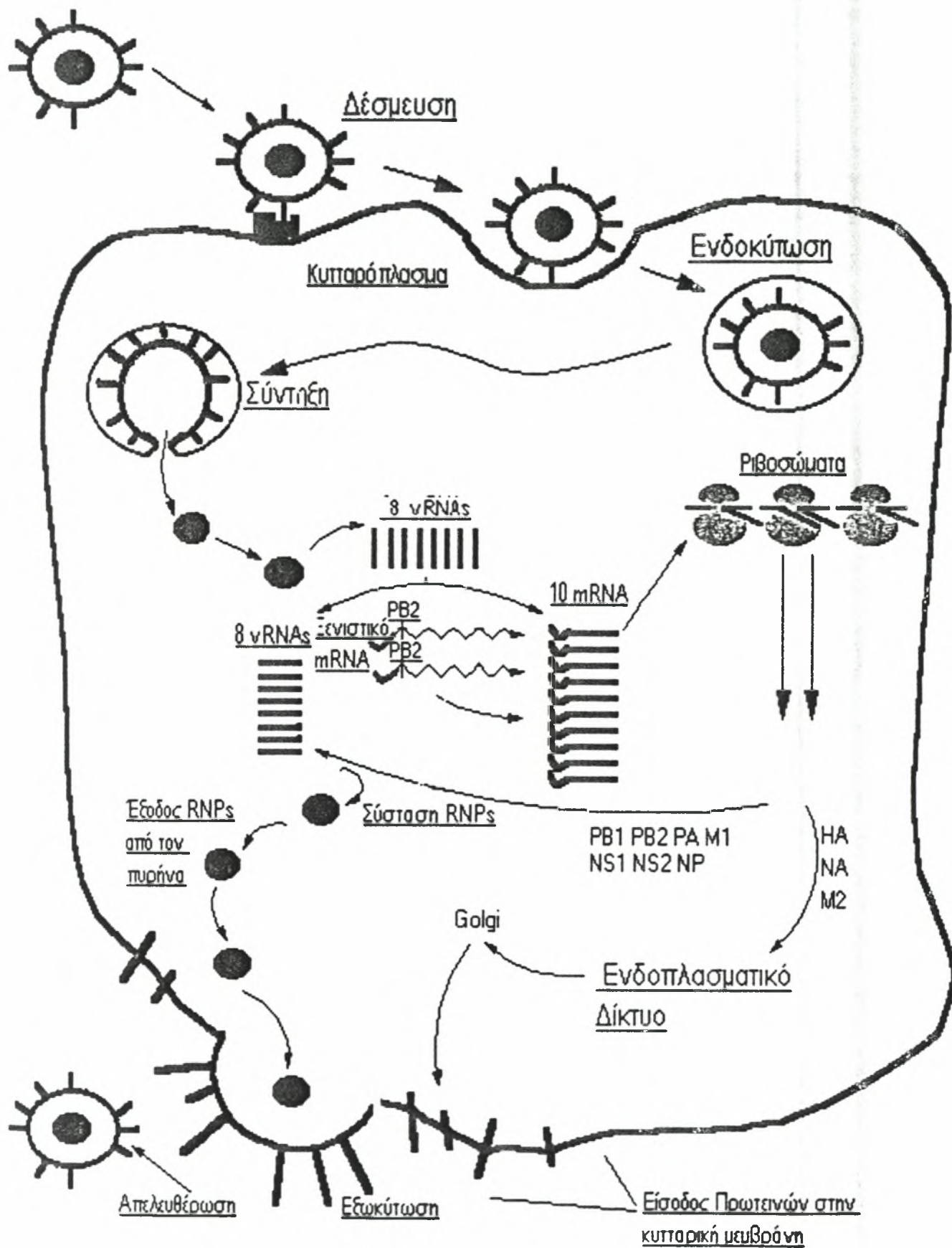
#### \* Ονοματολογία υποτύπων του *Influenza virus A*

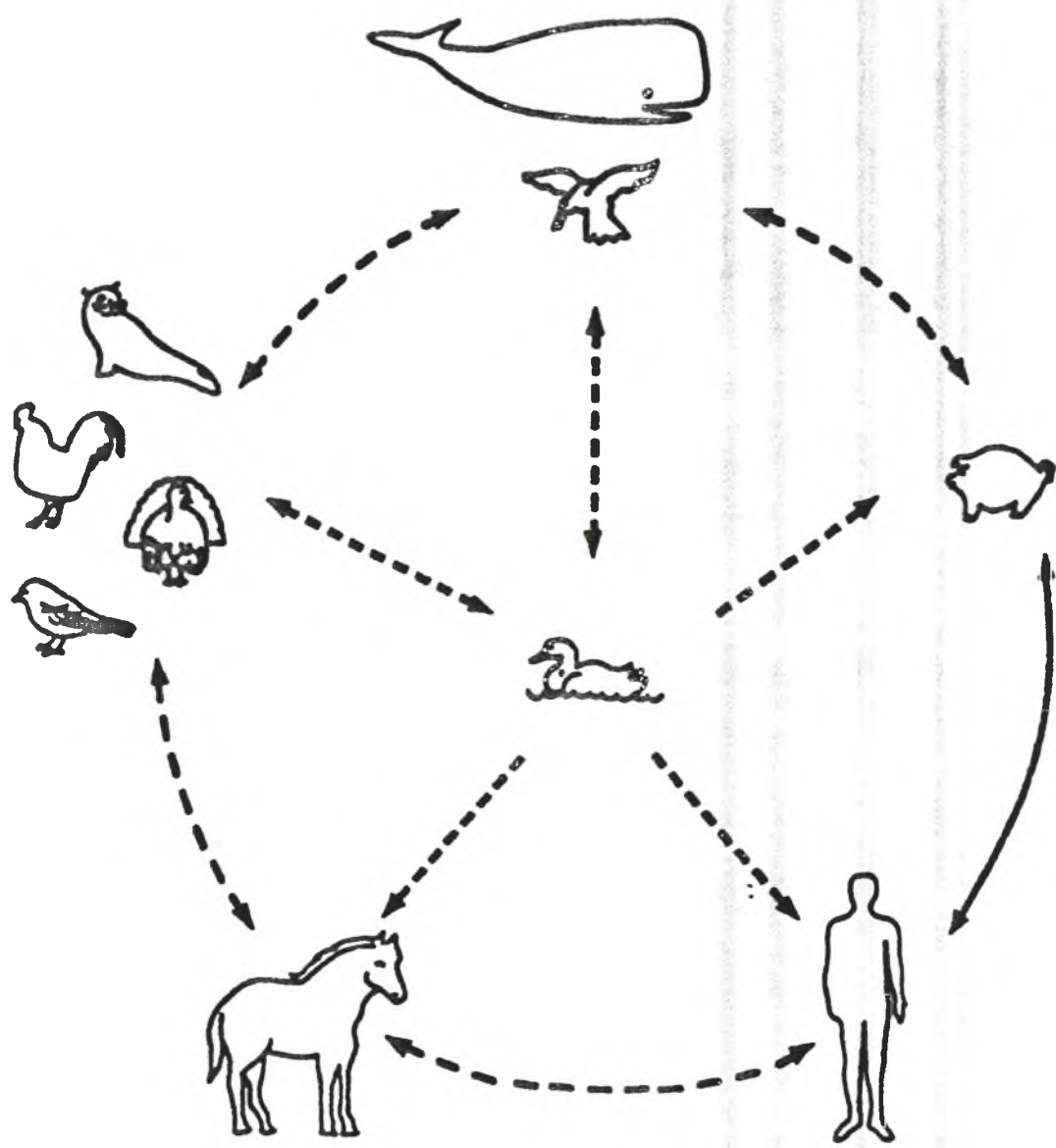
Οι υποτύποι του ιού της γρίπης τύπου A ονομάζονται με βάση τους υποτύπους των αντιγονικών πρωτεϊνών του ιού. Έτσι με H συμβολίζεται το HA αντιγόνο και με N το NA αντιγόνο. Στο όνομα πρώτος αναφέρεται ο υποτύπος του HA αντιγόνου (π.χ. H2) και δεύτερος ο υποτύπος του αντιγόνου NA (π.χ. N3). Ο υποτύπος που δημιουργείται με αυτή την αντιγονική σύσταση ονομάζεται H2N3.

---

\*Οι αριθμοί αναφέρονται μέχρι τον Ιούνιο του 2000

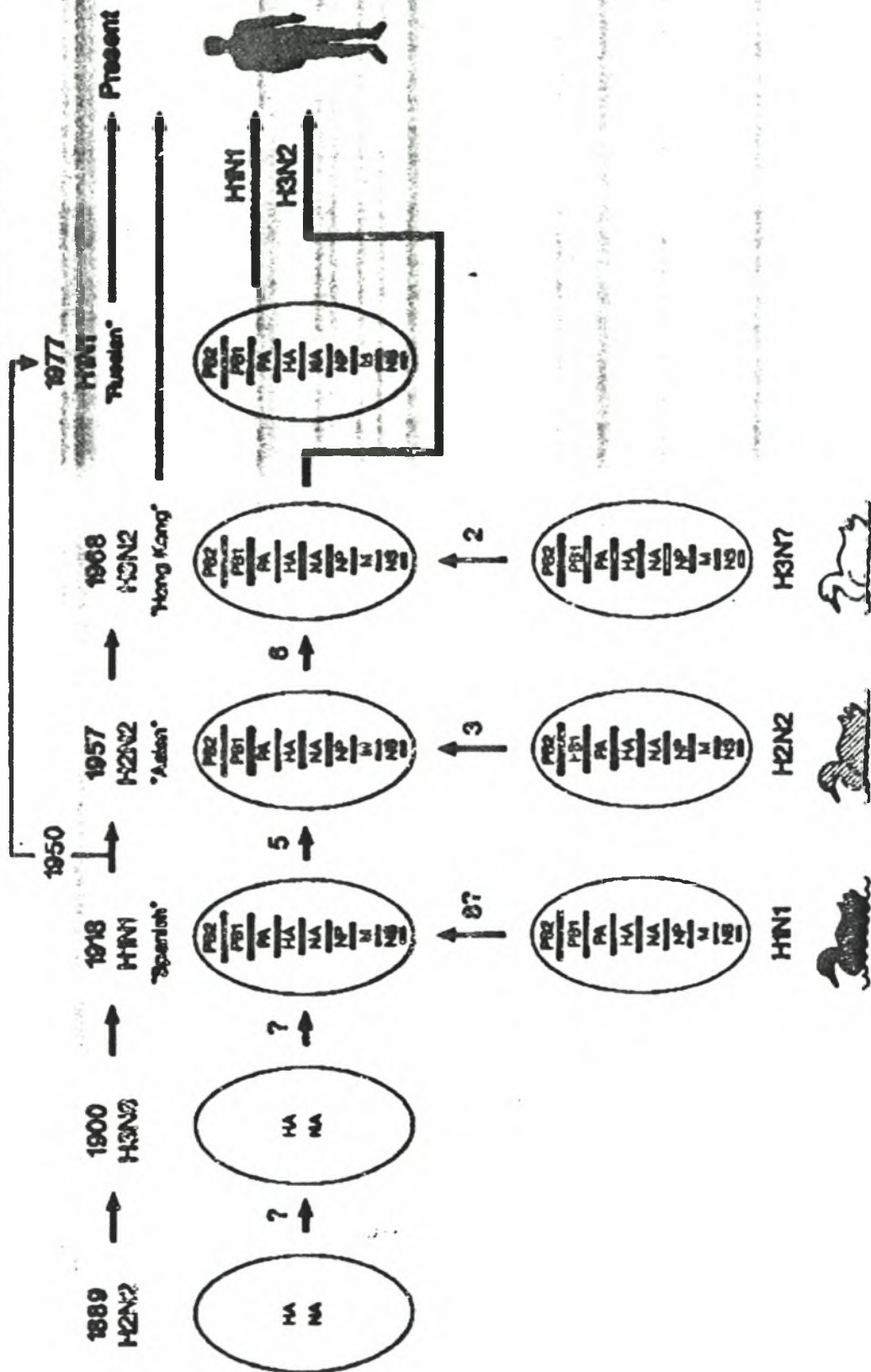
## Ο κύκλος ζωής του ιού της γρίπης περιληπτικά



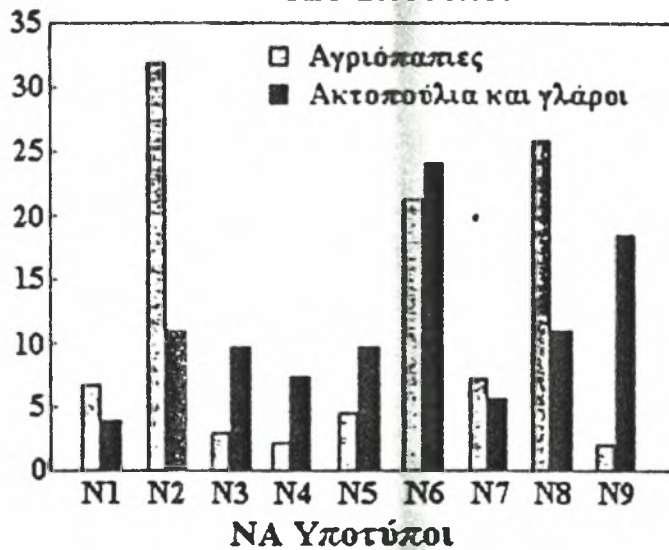
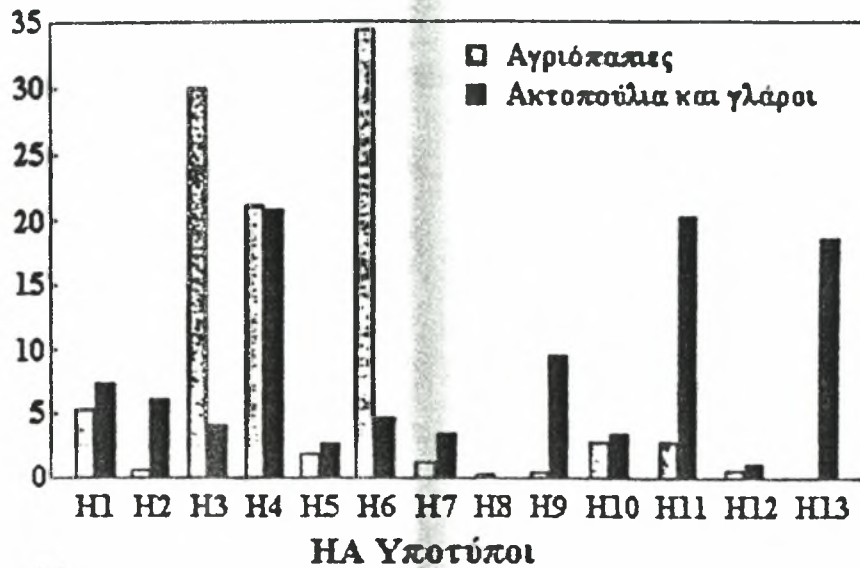


Εικόνα 1. Αποθήκες του ιού της γρίπης τύπου Α





Εικόνα 7. Αξιωματική εξέλιξη των κών τύπου Α που μπορούν να επανεμφανίζονται στους ανθρώπους



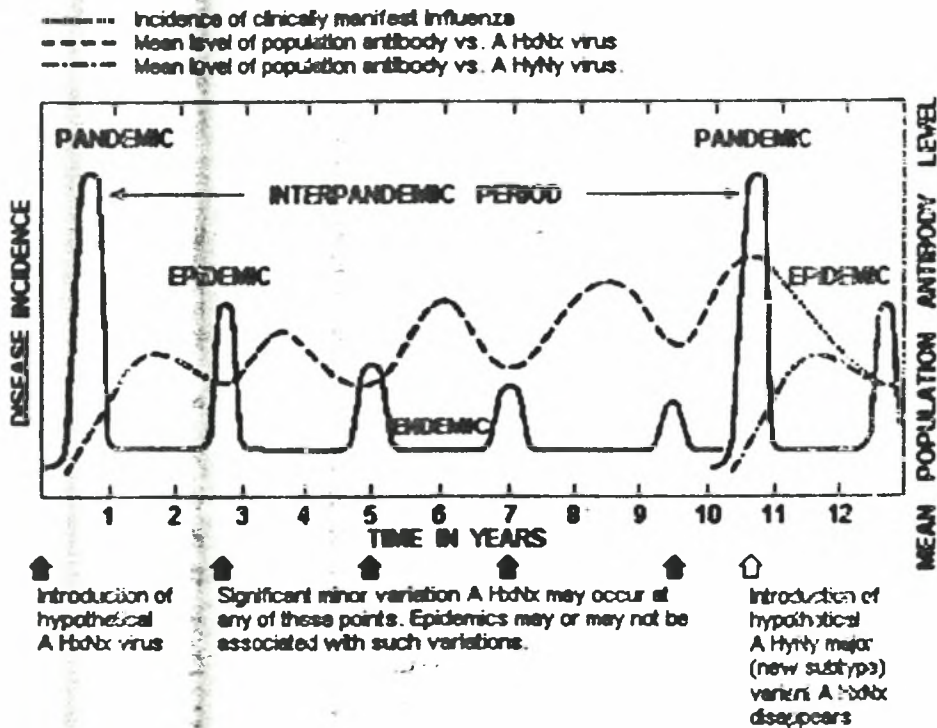
**Πίνακας 2.** Διανομή των υποτύπων των HA και NA του ιού της γρίπης τύπου Α. Τα νούμερα για τις αγριόπαπιες προέρχονται από εποπτεία 14 χρόνων (1978 – 1990) στην Alberta και τον Καναδά. Τα νούμερα για τα ακτοπούλια και τους γλάρους από εποπτεία 5 χρόνων (1986 – 1990) στο Delaware Bay και τις γειτονικές ακτές των Ηνωμένων Πολιτειών

### Αντιγονικοί υποτύποι του ιού Α που σχετίζονται με την πανδημική Γρίπη

Έτος	Παύση (έτη)	Όνομα	Έκταση της αντιγονικής αλλαγής	Σοβαρότητα της πανδημίας
1889	-	H3N2	- ;	Μίτρια
1918	29	H1N1	H+++ N+++	Σεβάρη
1957	39	H2N2	H+++ N+++	Σεβάρη
1968	11	H2N2	H+++ N-	Μίτρια
1977	9	H1N1	H+++ N+++	Ήσια

+ Μικρή αλλαγή ++ Μίτρια αλλαγή +++ Μεγάλη αλλαγή -Καμία αλλαγή

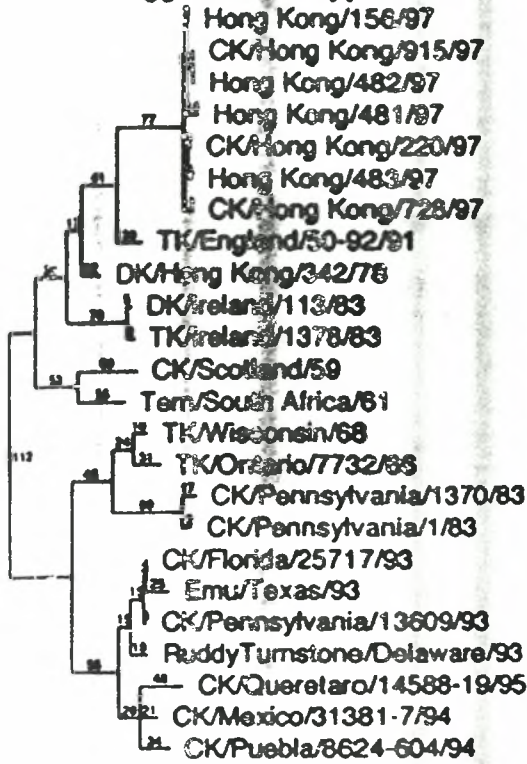
Πίνακας 2.



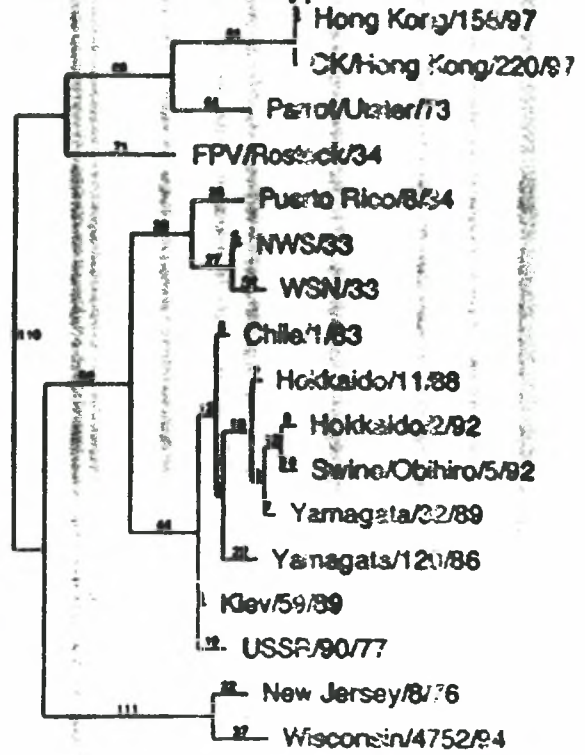
Πίνακας 3.



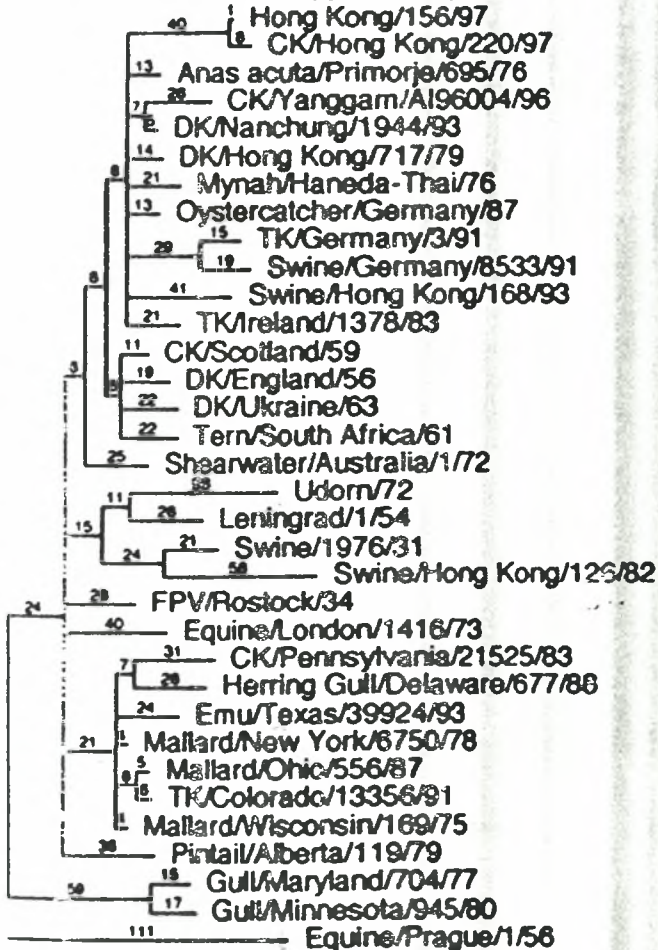
Hemagglutinin Subtype 5



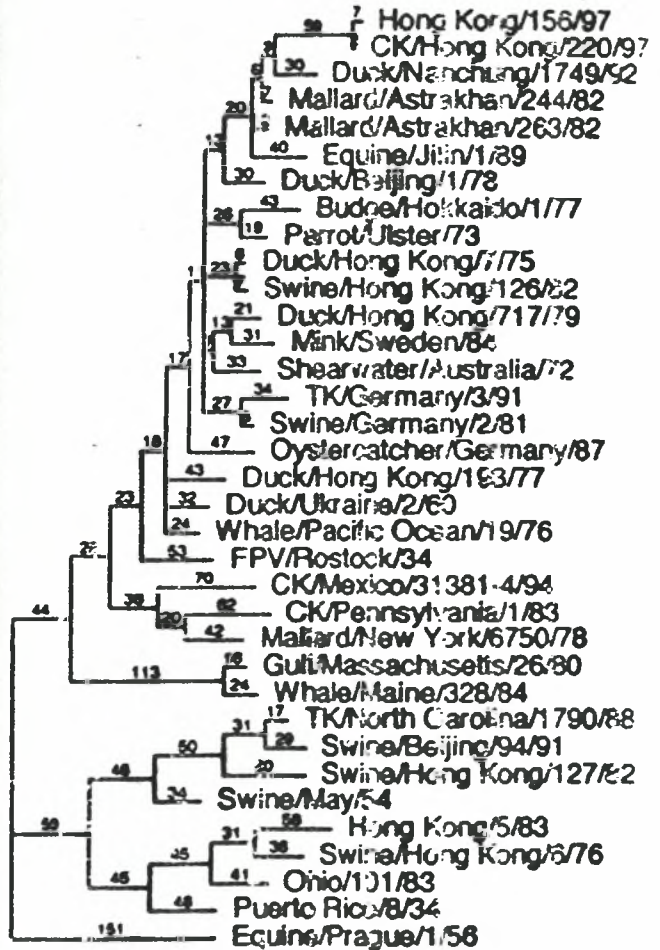
Neuraminidase Subtype 1

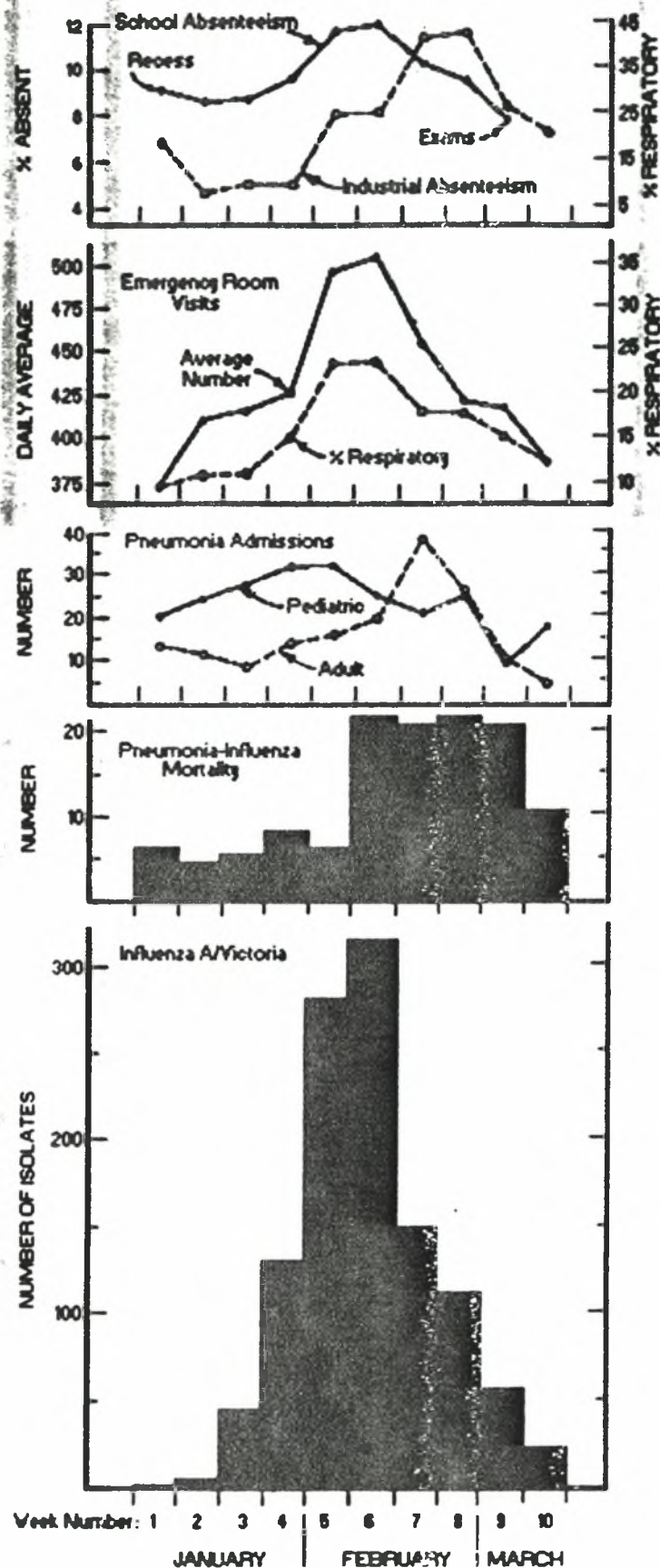


Nonstructural Subtype (Group) A



Nucleoprotein





Πίνακας 1.



## ► Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή της μοριακής τεχνικής, αντίστροφη μεταγραφάση-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR-nested), στην ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών γρίπης του ανθρώπου τύποι A και B και η σύγκριση αυτής με την ανοσοενζυμική μέθοδο, immunocapture-ELISA (IC-EIA) και την καλλιέργεια ιών γρίπης σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας. Η RT-PCR εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα, (ρινο-φαρυγγικά επιχρίσματα), μη-εμβολιασμένων ατόμων όλων των ηλικιών, με κλινική εικόνα γρίπης, που εστάλησαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γρίπης Νοτίου Ελλάδος στα πλαίσια της ετήσιας επίβλεψης της γρίπης, την περίοδο 1996-1999. Σαν μέθοδος αναφοράς στην συγκριτική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση ιών γρίπης σε καλλιέργεια αυγών και η ταυτοποίησή τους με την μέθοδο αναστολής της αιμοσυγκόλλησης. Προσδιορίστηκε η ευαισθησία, ειδικότητα, καθώς και η θετική και αρνητική διαγνωστική αξία της μεθόδου RT-PCR σε σύγκριση με την μέθοδο immunocapture-ELISA και την μέθοδο αναφοράς, στην ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών γρίπης τύπου A και τύπου B. Εγινε ανάπτυξη μιας παραλλαγής της μεθόδου RT-PCR, η φωλιασμένη (nested PCR), με δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των εκκινητικών μορίων ήταν γνωστές ως προς την τυποποίηση και υποτυποποίηση ιών γρίπης. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί των τύπων A, B και C και υποτύπων H1N1 και H3N2.

Οι ιοί γρίπης τύπου A (H3N2), επικράτησαν και απομονώθηκαν από δείγματα ασθενών στην Νότιο Ελλάδα, αλλά και παγκοσμίως, την περίοδο 1996-1999. Στελέχη του ιού A(H3N2), όπως το A/Nanchang/933/95, το A/Wuhan/359/95 και το A/Sydney/5/97 προκάλεσαν επιδημίες με σοβαρά συμπτώματα γρίπης σε άτομα

όλων των ηλικιών, καθώς και σοβαρές επιπλοκές όπως πνευμονίες. Οι ιοί A (H3N2) παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο ρυθμό εξέλιξης και μολυσματικής ικανότητας, λόγω της ταχείας μετάλλαξης του τμήματος HA1 της HA του ιού. Σκοπός της ανάπτυξης και εφαρμογής της μεθόδου RT-PCR-DNA sequencing στην ετήσια επίβλεψη της γρίπης, ήταν η ανάλυση των γονιδίων HA (HA1) και NA επιδημικών στελεχών γρίπης A (H3N2) που κυκλοφόρησαν στον πληθυσμό της Νοτίου Ελλάδος και καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας. Πιο συγκεκριμένα, έγινε εξακρίβωση της επίδρασης της καλλιέργειας σε εμβρυοφόρα αυγά, υπό την μορφή προσαρμοστικών μεταλλάξεων (host-mediated mutations), στην ιδιότητα των ιών αυτών να αιμοσυγκολλούν ερυθρά κύτταρα όρνιθας, καθώς και ο καθορισμός των θέσεων των αμινοξέων στην HA1 που επιφέρουν τις αλλαγές αυτές. Λόγω της συνεχούς εξέλιξης των ιών της γρίπης, και ειδικά των αντιγόνων HA και NA, είναι σημαντικό να γίνεται συστηματικά ανάλυση της ποικιλομορφίας των γονιδίων αυτών στο επίπεδο των αμινοξέων και ειδικά του τμήματος HA1 της HA. Έγινε σύγκριση της μοριακής ανάλυσης με αυτή της αντιγονικής, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση του γενότυπου στον φαινότυπο των ιών, κατόπιν καλλιέργειας αυτών. Τα προϊόντα της RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της αλληλουχίας των γονιδίων HA (HA1) και NA με την μέθοδο του DNA sequencing. Λόγω της παρουσίας γενετικών ανασυνδυασμών ειδικά σε ιούς A (H3N2) όπου μπορεί να προκύψουν στελέχη με υψηλή δυνατότητα πρόκλησης επιδημιών, έγινε φυλογενετική ανάλυση για την εξακρίβωση ανασυνδυασμένων στελεχών γρίπης και του ρυθμού εξέλιξης των ιών A (H3N2) που κυκλοφόρησαν στην Νότιο Ελλάδα την τριετία 1996-1999.

## ► ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Κλινικά δείγματα:** Η συλλογή των 500 ρινικών και φαρυγγικών επιχρίσματος έγινε από άτομα με κλινική εικόνα γρίπης, 3-4 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, κατά την διάρκεια επίβλεψης της γρίπης της Παγκοσμίου Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ.) την τριετία 1996-1999, από τον Οκτώβριο έως τον Απρίλιο, κάθε έτος. Οι ηλικίες των ατόμων ήταν από 20 ημέρες έως 65 έτη. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από μη-εμβολιασμένα άτομα στα εξωτερικά ιατρεία νοσοκομείων καθώς και σε ιδιωτικά ιατρεία και ιδρύματα από διάφορες περιοχές της Νοτίου Ελλάδος. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε 2,5 ml υλικού μεταφοράς ιών που περιελάμβανε 24,9 gr βακτο-τρυπτόζη, 5 gr ζελατίνη, 0,5 gr στρεπτομυκίνη, 500,000 U πενικιλίνη και 50 mg φουγκιζόνη ανά λίτρο, στους +4<sup>0</sup>C για μέχρι 2 ημέρες. Κατόπιν έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 1,500xg στους +4<sup>0</sup>C για 15 min.

**Απομόνωση και ταυτοποίηση ιών της γρίπης:** Όλα τα δείγματα καθώς και αρνητικοί μάρτυρες εμβολιάστηκαν στην αμνιακή (150 μl) και στην αλλαντοϊκή κοιλότητα (150 μl) εμβρυοφόρων αυγών κότας 8 ημερών. Η επώαση είχε διάρκεια 3 ημερών στους 33<sup>0</sup>C. Κατόπιν, έγινε συλλογή των αμνιακών και αλλαντοϊκών υγρών και έλεγχος του ιικού τίτλου σε μονάδες HA, με την μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης (HA), με 0,5% ερυθρά αιμοσφαίρια κότας. Όλα τα δείγματα καλλιεργήθηκαν τουλάχιστον δύο περάσματα σε αυγά. Η ταυτοποίηση έγινε με την μέθοδο αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (HAI) χρησιμοποιώντας αντιορούς της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας ειδικούς στους υπότυπους H1N1, H3N2 και B.

**Immunocapture ELISA:** Στα αρχικά κλινικά δείγματα έγινε έλεγχος με την IC ELISA ως προς τον τύπο A και τύπο B της γρίπης χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα της Π.Ο.Υ. έναντι της νουκλεοπρωτεΐνης του κάθε τύπου ιού. Τα πολυκλωνικά αντισώματα ήταν έναντι της γρίπης τύπου A και τύπου B, αραιωμένα 1/6.000 σε 0.05 M σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 9,6). Η επώαση των πολυκλωνικών αντισωμάτων έγινε σε πλάκες τύπου ELISA, στους +4<sup>0</sup>C για 24 hr. Όλες οι πλάκες περιελάμβαναν 100μl κλινικό δείγμα καθώς και 100μl αρνητικό και 100μl θετικό μάρτυρα. Η επώαση των δειγμάτων έγινε στους 37<sup>0</sup>C για 1hr. Οι πλάκες πλύθηκαν 5 φορές σε PBS και κατόπιν έγινε προσθήκη 100μl μονοκλωνικού αντισώματος αραιωμένο 1/1.250 σε PBS και οι πλάκες επωάστηκαν στους 37<sup>0</sup>C για 1hr.

**Επιλογή των στελεχών του ιού για μελέτη της αλληλουχίας του DNA:** 18 στελέχη γρίπης τύπου A (H3N2) που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα κατά την περίοδο αυξημένης δραστηριότητας της γρίπης στην Νότια Ελλάδα, επιλέχθηκαν για μοριακή ανάλυση των γονιδίων της HA1 και της NA. Η βαρύτητα των κλινικών συμπτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για την επιλογή των στελεχών. Τα συμπτώματα περιελάμβαναν εμπύρετο (άνω των 38,5<sup>0</sup>C, μυαλγία, κεφαλαλγία, ρινίτιδα, λαρυγγίτιδα, βήχα και γενική κόπωση), καθώς και επιπλοκές, όπως βρογχίτιδα και πνευμονία. Τα στελέχη γρίπης A (H3N2) που απομονώθηκαν σε αυγά παρουσίασαν τίτλο HA άνω του 1:256. Σε ορισμένα από τα στελέχη έγιναν δύο περεταίρω περάσματα στην αλλαντοϊκή κοιλότητα των αυγών για την αύξηση του ιικού τίτλου.

**Απομόνωση RNA του ιού και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA):** 200-250 μl υλικού από το αρχικό δείγμα και η ίδια ποσότητα αμνιακού ή αλλαντοϊκού υγρού χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA με 350 μl TRIzol (Gibco BRL) στην παρουσία 20 μg γλυκογόνου. Πρότυπα στελέχη γρίπης τύπου A (H1N1) και (H3N2)

και τύπου B χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες και μη-εμβολιασμένα αλλαντοικά υγρά ως αρνητικοί. Η αντίδραση για την σύνθεση του cDNA περιελάμβανε 5μl RNA, 2,5μl εκκινητικά μόρια (40μg/μl), 20U/μl Rnasin, 5μl 5X ρυθμιστικό διάλυμα και 100U/tube M-MLV αντίστροφη τρανσκριπτάση.

**Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR):** Στην PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί του τύπου A και B (γονίδιο του υποστρώματος) και υποτύπων H1, H2, H3 και N1, N2. Η PCR έγινε σε δύο στάδια για την εξασφάλιση μέγιστης ευαισθησίας. Η πρώτη αντίδραση περιελάμβανε 25 κύκλους και η δεύτερη 40. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε σε 2% αγαρόζη σε 1X TBE με 1 μg/ml βρωμιούχο εθίδιο.

**Εξακρίβωση της αλληλουχίας των γονιδίων HA1 και NA και φυλογενετική ανάλυση:** Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και έγινε ποσοτικός προσδιορισμός σε 1% αγαρόζη. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά μόρια ειδικά του τμήματος HA1 και του NA. Οι αλληλουχίες των κλινικών στελεχών συγκρίθηκαν με αυτές των στελεχών A (H3N2) του εμβολίου της περιόδου 1996-1999, οι οποίες αναζητήθηκαν στην γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (Genbank). Η φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL X, χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανάλυσης neighbor-joining.

**Στατιστική ανάλυση:** Το πρόγραμμα SPSS για την ανάλυση των δεδομένων απο την παρούσα μελέτη. Η εξακρίβωση πιθανών διαφορών μεταξύ των δύο μεθόδων ανίχνευσης έγινε με το chi-square test ( $\chi^2$ ).

## ► ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με την μέθοδο αναφοράς, απο τα 150 κλινικά δείγματα, τα 25 (16,7%) ήταν θετικά για ιό γρίπης, 19 (76%) για τύπο A (H3N2) και 6 (24%) για τύπο B. Με την μέθοδο IC ELISA, 17 (11,3%) δείγματα ήταν θετικά σε ιό γρίπης. Απο αυτά 13 (76,4%) ήταν τύπου A και 4 (30,7%) τύπου B. Οκτώ επιπλέον θετικά δείγματα ανιχνεύτηκαν (6 A και 2 B), με την IC ELISA, έπειτα από τρία περάσματα των αρχικών δειγμάτων σε εμβρυοφόρα αυγά κότας. Από τα 25 θετικά με την IC ELISA, 24 (96%) βρέθηκαν θετικά για γρίπη με την μέθοδο αναφοράς. Ενα αρχικό δείγμα, θετικό με IC ELISA, ήταν αρνητικό μετά απο τρία περάσματα σε αυγά. Συνεπώς, η IC ELISA υποεκτίμησε τα θετικά στην γρίπη δείγματα σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς. Ακολουθεί ότι κατόπιν καλλιέργειας αυξήθηκε η συγκέντρωση ικών σωματιδίων, όπου ανιχνεύτηκαν με την ανωτέρω μέθοδο. Στα ίδια δείγματα ο έλεγχος με την μέθοδο RT-PCR, αποκάλυψε 29 (19,3%) θετικά σε ιό γρίπης, 22 (75,8%) με τύπο A (H3N2) και 7 (24%) με τύπο B. Ολα τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά με την μέθοδο αναφοράς ήταν θετικά και με την RT-PCR. Επιπλέον, υπήρξε 100% ταυτοσιμότητα των αποτελεσμάτων της RT-PCR και της απομόνωσης του ιού σχετικά με τον τύπο και υπότυπο. Με την RT-PCR, βρέθηκαν επιπλέον 4 θετικά δείγματα, 3A και 1 B, σε σύγκριση με την μέθοδο απομόνωσης του ιού. Αυτά τα θετικά με RT-PCR ήταν αρνητικά κατόπιν τριών περασμάτων σε αυγά.

Βάσει της αντιγονικής και μοριακής ανάλυσης του γονιδιακού τμήματος HA1 της αιμοσυγκολλητίνης και του γονιδίου της νευραμινιδάσης, επιλεγμένων επιδημικών στελεχών A (H3N2) της περιόδου 1996-1999, προκύπτει ότι η HA1 των κλινικών στελεχών διαφοροποιείται απο αυτή των στελεχών του εμβολίου της τελευταίας τετραετίας. Η ανάλυση των 350 κλινικών δειγμάτων έδειξε ότι 31 (8,9%) ήταν θετικά

στην γρίπη. Απο αυτά τα 26 (84%), ήταν Α (H3N2) και 5 (16%) τύπου Β. Τα 18 κλινικά στελέχη στα οποία έγινε η μοριακή ανάλυση, διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες, βάσει της αντιγονικής ανάλυσης. Η πρώτη ομάδα περιέχει ιούς που προσομοιάζουν του στελέχους A/Wuhan/359/95, η δεύτερη ομάδα περιέχει στελέχη που προσομοιάζουν στο A/South Africa/1147/96 και απομονώθηκαν την περίοδο 1997-1998 και η τρίτη ομάδα στελεχών της περιόδου 1997-1998 και 1998-1999, που προσομοιάζαν του A/Sydney/5/97. Η ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας της HA1 των 18 στελεχών γρίπης έγινε κατόπιν τριών περασμάτων των αρχικών δειγμάτων σε εμβρυοφόρα αυγά. Οι αλληλουχίες του DNA μετατράπηκαν σε αμινοξέα και έγινε σύγκριση με τις ανάλογες αλληλουχίες των προτύπων στελεχών A/Johannesburg/33/94, A/Nanchang/933/95, A/Wuhan/359/95 και A/Sydney/5/97. Βάσει της μοριακής ανάλυσης της HA1 τα κλινικά στελέχη διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες. Η πρώτη και η δεύτερη περιέχουν A/Wuhan/359/95 και A/South Africa/1147/96 αλλαγές στα αμινοξέα όπως Lys στην θέση 62, Val στην θέση 144, Gly στην θέση 124, Asp στην θέση 133 και Arg στην θέση 142. Η τρίτη ομάδα περιελάμβανε αλλαγές τύπου A/Sydney/5/97 όπως Gln στην θέση 156, Lys στην θέση 158, Ala στην θέση 196 και Lys στην θέση 276. Πιο συγκεκριμένα, ένα από τα κλινικά στελέχη περιείχε στην θέση 186 ισολευκίνη (Ile), ενώ στίς θέσεις 194 και 226 περιείχαν βαλίνη (Val), δύο και δεκατρία κλινικά στελέχη της περιόδου 1996-1997 και 1996-1999, αντίστοιχα.

Οι αλλαγές των αμινοξέων βρίσκονται ανάμεσα στις αντιγονικές θέσεις Α και Β της HA1. Στην θέση 186 παρατηρήθηκε μια αλλαγή Ser σε Ile, η οποία είναι χαρακτηριστική των προσαρμοστικών μεταλλάξεων στα αυγά. Η θέση 194, η οποία βρίσκεται στην αντιγονική θέση Β και εμπλέκεται στην σύζευξη της HA με τον κυτταρικό υποδοχέα, είχε υποστεί αλλαγή Ile σε Val σε δύο στελέχη της επιδημικής



περιόδου του Ιανουαρίου του 1998. Η θέση 226 η οποία παίζει ρόλο στην ειδικότητα του υποδοχέα και στην παρουσία φραγμού ξενιστών, παρουσίασε αλλαγή τύπου Ηε σε Val, στην πλειοψηφία των κλινικών στελεχών (13 από τα 18). Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις θέσεις 186, 194 και 226 απουσίαζαν από όλα τα στελέχη αναφοράς που εξετάστηκαν, υποδεικνύοντας σαν πιθανή αιτία αυτών, την προσαρμογή των ιών στα αυγά και κατά συνέπεια την επαναφορά της αιμοσυγκολλητικής ιδιότητας αυτών. Όλες οι συγκρίσεις των αλληλουχιών των αμινοξέων της HA1 και της NA των κλινικών στελεχών, έγιναν με βάση την αντίστοιχη αλληλουχία του τμήματος HA1 και NA του στελέχους αναφοράς A/Sydney/5/97 (H3N2).

Ανάλυση των αλληλουχιών της NA των κλινικών στελεχών, αποκάλυψε σημαντικά λιγότερες αλλαγές σε σύγκριση με την HA1. Οι ποικιλομορφίες του γονιδίου της NA χωρίζουν τα στελέχη σε δύο ομάδες. Η πρώτη παρουσίασε αλλαγές τύπου A/Wuhan/359/95, όπως Asn στην θέση 43, Leu στην θέση 370, και Gly στην θέση 381. Η αλλαγή Tyr στην θέση 336 και Asp στην θέση 339 που παρατηρήθηκαν για ένα στέλεχος της περιόδου 1996-1997, μπορεί πιθανώς να επηρεάζει την αντιγονικότητα του συγκεκριμένου στελέχους του ιού. Η μοριακή ανάλυση της νευραμινιδάσης επίσης αποκάλυψε μια αλλαγή Asp σε Asn στην θέση 198 σε ένα A/Wuhan/359/95-προσομοιάζον στέλεχος της περιόδου 1996-1997. Μια τέτοια αλλαγή θα μπορούσε να επηρεάσει την ενζυματική ιδιότητα της NA (5, 36).

Η μοριακή και η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων HA1 και NA των ανωτέρω κλινικών στελεχών, εμφάνισαν ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος της περιόδου 1997-1998, με την HA1 να προσομοιάζει με ιούς τύπου A/Wuhan/359/95 και την NA να προσομοιάζει ιούς τύπου A/Sydney/5/97. Τα αποτελέσματα της αντιγονικής



ανάλυσης έδειξαν ότι το στέλεχος προσομοιάζει με ιούς τύπου A/Wuhan/359/95. Λαμβάνοντας υπ'οψη ότι ο ιός αυτός απομονώθηκε κατά την διάρκεια της παγκόσμιας επικράτησης ιών τύπου A/Sydney/5/97, την περίοδο 1997-1998, αποδुकνεί ότι πρόκειται για ανασυνδυασμένο στέλεχος του ιού με μεγαλύτερη δυνατότητα επικράτησης και πρόκλησης επιδημιών. Δεδομένου ότι το στέλεχος αυτό (A/Athens/94/98 (H3N2)) απομονώθηκε κατά την διάρκεια έντονης επιδημικής δραστηριότητας της γρίπης στην νότια Ελλάδα, τεκμηριώνει την θεωρία για την επικράτηση στον πληθυσμό ανασυνδυασμένων στελεχών γρίπης τύπου H3N2.

Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι ένα σημαντικό τμήμα της ετήσιας επίβλεψης της γρίπης είναι η έγκαιρη απομόνωση και ανάλυση με μοριακές τεχνικές 'νέων' στελεχών του ιού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καλύτερη προστασία της δημόσιας υγείας μέσω του αντιγριπικού εμβολιασμού και την λήψη μέτρων απο τους αρμόδιους κρατικούς φορείς. Το παράδειγμα της επιλογής στελεχών A (H3N2) για την εμβολιαστική περίοδο 1997-1998 είναι χαρακτηριστικό της μεγάλης σημασίας της συνεχούς επίβλεψης της γρίπης, επιδημιολογική και εργαστηριακή και ειδικά σε μοριακό επίπεδο, για την έγκαιρη και ευαίσθητη ταυτοποίηση στελεχών του ιού με υψηλό παθογόνο δυνατότητα.

Ειδικότερα, όσον αφορά την συστηματική καλλιέργεια κλινικών στελεχών γρίπης σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, σαν μέρος της ετήσιας επίβλεψης της γρίπης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, είναι αναγκαίο να γίνεται έλεγχος για πιθανές αλλαγές στην HA1 που θα μπορούσαν να επιφέρουν τροποποίηση στην τελική ταυτοποίηση του αντίστοιχου στελεχού γρίπης που κυκλοφορεί στον πληθυσμό.

### **Φυλογενετική ανάλυση:**

Η φυλογενετική ανάλυση επιβεβαίωσε τον ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης της HA σε σύγκριση με την NA. Τα κλινικά στελέχη διαφοροποιήθηκαν σε τρεις φυλογενετικές ομάδες των ομοιοτήτων της HA1, η πρώτη ομάδα περιελάμβανε ιούς τύπου A/Wuhan/359/95, η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε ενδιάμεσους ιούς ανάμεσα στο A/Wuhan/359/95 και στο A/Sydney/5/97 και η τρίτη ομάδα που περιελάμβανε ιούς πλησίον του A/Sydney/5/97.

Σύμφωνα με την σύγκριση των αλληλουχιών NA και της συγγένειας αυτών μεταξύ των στελέχων αναφοράς και των αντιστοίχων των κλινικών στελεχών, παρουσιάζονται δύο φυλογενετικές ομάδες. Η πρώτη είναι πλησίον του A/Wuhan/359/95 και η δεύτερη πλησίον του A/Sydney/5/97. Συμπερασματικά, από την φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι η HA1 παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης σε σύγκριση με την NA, όπως εμφανίζεται και από την μοριακή ανάλυση.

**Πίνακας 1:** Αριθμός θετικών και αρνητικών σε ιό της γρίπης κλινικών δειγμάτων με τις μεθόδους: απομόνωση του ιού, IC ELISA and RT-PCR.

Μέθοδοι	Αριθμός δειγμάτων, n=150	
	Θετικά	Αρνητικά
Απομόνωση του ιού	25 (16.7 %)	125 (83.3 %)
IC ELISA στα αρχικά δείγματα	17 (11.3%)	133 (88.7%)
IC ELISA στα καλλιεργειμένα δείγματα	25 (16.7%)	125 (83.3%)
RT-PCR στα αρχικά δείγματα	29 (19.3%)	121 (80.7%)
RT-PCR στα καλλιεργειμένα δείγματα	29 (19.3%)	121 (80.7%)

**Πίνακας 2:** Ανίχνευση ιών γρίπης στα αρχικά δείγματα: απομόνωση ιού, IC ELISA και RT-PCR, (n= 150).

Μέθοδοι		Αριθμός δειγμάτων	Απομόνωση ιού	IC ELISA	RT-PCR
Απομόνωση ιού	θετικό	25		16 (64%)	25 (100%)
	αρνητικό	125		125 (100%)	121 (96.8%)
IC ELISA	θετικό	17	16 (64%)		17 (100%)
	αρνητικό	133	125 (94%)		121 (91%)
RT-PCR	θετικό	29	25 (86.2%)	17 (58.6%)	
	αρνητικό	121	121 (100%)	121 (100%)	

**Πίνακας 3:** 1<sup>ο</sup> Έτος. Αριθμός θετικών και αρνητικών στην γρίπη δειγμάτων: απομόνωση του ιού, IC ELISA και RT-PCR

Μέθοδοι	n=70	
	Θετικό	Αρνητικό
Απομόνωση ιού	11 (15.7 %)	59 (84.3 %)
IC ELISA στα αρχικά δείγματα	7 (10%)	63 (90%)
IC ELISA στα καλλιεργημένα δείγματα		59 (84.3%)
RT-PCR στα αρχικά δείγματα samples	13 (18.6%)	57 (81.4%)
RT-PCR στα καλλιεργημένα δείγματα	13 (18.6%)	57 (81.4%)

**Πίνακας 4:** 2<sup>ο</sup> Έτος. Αριθμός θετικών και αρνητικών στη γρίπη δειγμάτων: απομόνωση του ιού, IC ELISA and RT-PCR.

Μέθοδοι	n= 80	
	Θετικό	Αρνητικό
Απομόνωση του ιού	14 (17.5 %)	66 (82.5 %)
IC ELISA στα αρχικά δείγματα	10 (12.5%)	70 (87.5%)
IC ELISA στα καλλιεργημένα δείγματα	14 (17.5%)	66 (82.5%)
RT-PCR στα αρχικά δείγματα	16 (20%)	64 (80%)
RT-PCR στα καλλιεργημένα δείγματα	16 (20%)	64 (80%)

**Πίνακας 5:** Ευαισθησία, ειδικότητα, διαγνωστική αξία, ψευδώς θετικά και αρνητικά, για τις μεθόδους IC ELISA και RT-PCR.

Μέθοδοι	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Διαγνωστική αξία		Ψευδώς	
			Θετική	Αρνητική	Θετικά	Αρνητικά
IC ELISA στα αρχικά δείγματα	64 %	98.4 %	94.1 %	92.5 %	5.9 %	7.5 %
IC ELISA στα καλλιεργημένα δείγματα	100 %	100 %	100 %	100 %	0 %	0 %
RT-PCR στα αρχικά δείγματα	100 %	96.8 %	86.2 %	100 %	13.8 %	0 %
RT-PCR στα καλλιεργημένα δείγματα	100 %	96.8 %	86.2 %	100 %	13.8 %	0 %

**Πίνακας 1.** Στελέχη γρίπης Α (H3N2) που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

<b>Ιοί</b>	<b>Σύντμηση</b>	<b>Ημερομηνία συλλογής</b>	<b>Αριθμός GenBank</b>
A/Aichi/2/68	Aichi268		
A/Hong Kong/8/68	HK868		U42630
A/Udorn/307/72	Udorn30772		J02168
A/Victoria/3/75	VC375		J02172
A/Johannesbourg/33/94	JHB3394		U43425
A/Wuhan/359/95	WUH35995		U51246
A/Nanchang/933/95	NC93395		
A/Sydney/5/97	SYD597		
A/Shangdong/9/93	SH993		U43419
A/New York/16/94	NY1694		U43424
A/Beijing/353/89	BE35389		U42635
A/Shanghai/11/87	SH1187		
A/Beijing/32/92	BE3292		U42770
A/Alaska/10/95	AK1095		U51245
A/Stockholm/18/98	ST1898		
A/Victoria/30/97	VC3097		
A/Wellington/3/97	WE397		
A/Panama/2007/99	PA200799		ISDNSW0002
A/Umea/3/00	Umea300		AF180633
A/Malmeo/3/99	Malmoe399		AF180579
A/Beijing/244/96	BE24496		ISDNCDA001
A/Shanghai/24/90	SG2490		ISDNSWA015
A/Guangdong/25/93	GD2593		ISDNSWA10
A/India/263/93	India26393		AF180586
A/Singapore/7/94	SN794		
A/Miyagi/29/95	MY2995		U42636
A/Fukushima/140/96	FU14096		U42778
			U42780
			U43422
			U71143
			AF038263



Ιοί Σύντμηση Ημερομηνία συλλογής Αριθμός GenBank

**Κλινικά στελέχη γρίπης**

**1996-1997**

IOI	Syntmηση	Hmeromhnia syllogis	HA1	NA
A/Greece/1/97	G197	30/1/97	AF315567	AF316811
A/Athens/2/97	A297	20/1/97	AF315568	AF316812
A/Greece/4/97	G497	15/2/97	AF315569	
A/Athens/23/97	A2397	15/2/97	AF315570	

**1997-1998**

A/Athens/1/98	A198	30/1/98	AF315571	AF316814
A/Athens/2/98	A298	30/1/98	AF316817	
A/Athens/7/98	G798	10/2/98	AF316818	
A/Greece/10/98	G1098	10/2/98	AF316819	
A/Athens/16/98	A1698	24/2/98	AF316820	AF316815
A/Greece/18/98	G1898	24/2/98	AF316821	AF316816
A/Greece/19/98	G1998	24/2/98	AF315559	
A/Athens/76/98	A7698	10/3/98	AF315560	AF316805
A/Athens/94/98	A9498	10/3/98	AF315561	AF316806
A/Greece/103/98	G10398	18/3/98	AF315562	
A/Greece/106/98	G10698	20/3/98	AF315563	AF316807

**1998-1999**

A/Greece/109/99	G10999	25/2/99	AF315564	AF316808
A/Greece/132/99	G13299	19/4/99	AF315565	AF316809
A/Athens/135/99	A13599	19/4/99	AF315566	AF316810

Πίνακας 2. Αντιγονική ανάλυση κλινικών στελεχών γρίπης με την μέθοδο αναστολής της αιμοσυγκόλλησης.

	post infection ferret sera					
	A/JHB 33/94	A/Wuh 359/95	A/NC 933/95	A/SA 1147/96	A/Brat 6/97	A/Syd 5/97
A/JHB/33/94	<b>1280</b>	80	80	40	80	<*
A/Wuhan/359/95	160	<b>2560</b>	1280	320	160	<
A/Nanchang/933/95	160	1280	<b>2560</b>	320	320	160
A/South Africa/1147/96	80	160	320	<b>1280</b>	320	320
A/Bratislava/6/97	80	320	320	320	<b>640</b>	160
A/Sydney/5/97	<	80	80	320	320	<b>2560</b>
<b>Ομάδα 1**</b>						
A/Greece/1/97	<	<b>640</b>	320	160	160	80
A/Athens/94/98	<	<b>640</b>	320	160	320	80
<b>Ομάδα 2</b>						
A/Athens/2/97	80	160	640	<b>1280</b>	320	160
A/Greece/4/97	80	160	640	<b>1280</b>	320	160
A/Athens/23/97	160	320	640	<b>1280</b>	640	320
A/Athens/1/98	80	160	320	<b>640</b>	320	160
A/Athens/2/98	80	160	320	<b>640</b>	320	160
<b>Ομάδα 3</b>						
A/Athens/7/98	<	160	160	320	160	<b>1280</b>
A/Greece/10/98	<	160	320	640	320	<b>2560</b>
A/Athens/16/98	<	320	320	320	160	<b>2560</b>
A/Greece/18/98	<	320	320	320	160	<b>2560</b>
A/Greece/19/98	<	80	80	160	80	<b>640</b>
A/Athens/76/98	<	160	320	640	320	<b>2560</b>
A/Greece/103/98	<	160	160	320	160	<b>640</b>
A/Greece/106/98	<	160	160	320	160	<b>640</b>
A/Greece/109/99	<	160	160	320	160	<b>640</b>
A/Greece/132/99	<	80	160	160	160	<b>1280</b>
A/Athens/135/99	<	80	160	160	160	<b>1280</b>

\*< τίτλος λιγότερος από 40.

\*\* Οι ομάδες 1, 2 και 3 αντιπροσωπεύουν ιούς όμοιους προς τα στελέχη αναφοράς A/Wuhan/359/95, A/South Africa/1147/96 και A/Sydney/05/97, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.** Ποικιλομορφία των αλληλουχιών των αμινοξέων του γονιδιακού τμήματος HA1 των κλινικών στελεχών A (H3N2).

**Ομάδα 1:** A/Wuhan/359/95 προσομοιάζον αλλαγές  
Θέσεις: Lys 62, Thr 121, Gly 124, Asp 133, Val 144  
Glu 158 και Asn 276

Στελέχη: G197 και A9498

**Ομάδα 2:** A/South Africa/1147/96 προσομοιάζον αλλαγές  
Θέσεις: Arg 142, Val 144, Lys 156 και Val 196

Στελέχη: A297, G497, A2397, A198 και A298

**Ομάδα 3:** A/Sydney/5/97 προσομοιάζον αλλαγές  
Θέσεις: Glu 62, Ile 144, Gln 156, Lys 158, Ala 196  
και Lys 276

Στελέχη: A798, G1098, A1698, G1898, G1998,  
A7698, G10398, G10698, G10999, G13299 και  
A13599

**Πίνακας 4.** Ποικιλομορφία των αλληλουχιών των αμινοξέων του γονιδίου NA των κλινικών στελεχών A (H3N2).

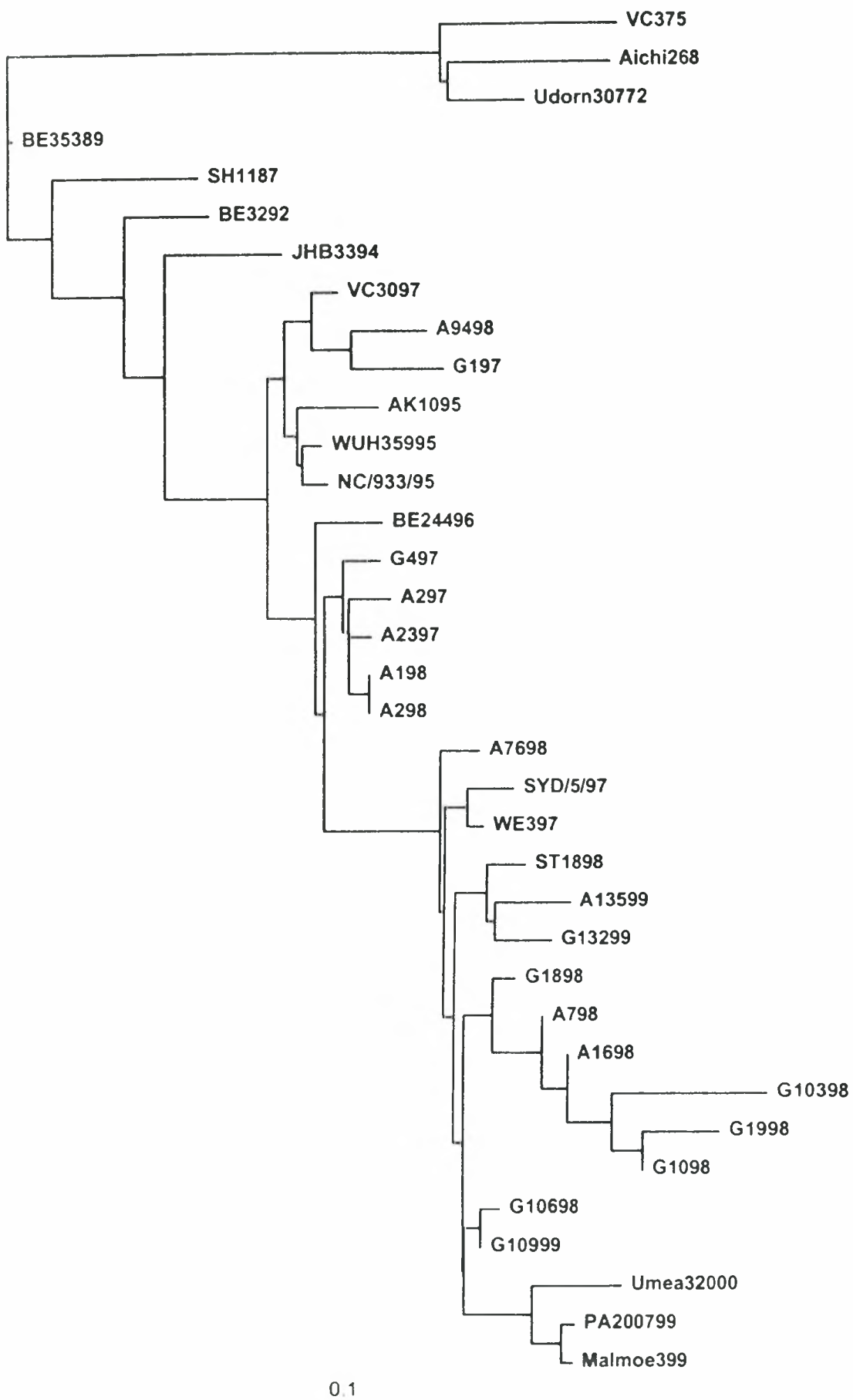
**Ομάδα 1:** A/Wuhan/359/95 προσομοιάζουν αλλαγές  
Θέσεις: Asn 43, Leu 370, and Gly 381

Στέλεχος G197

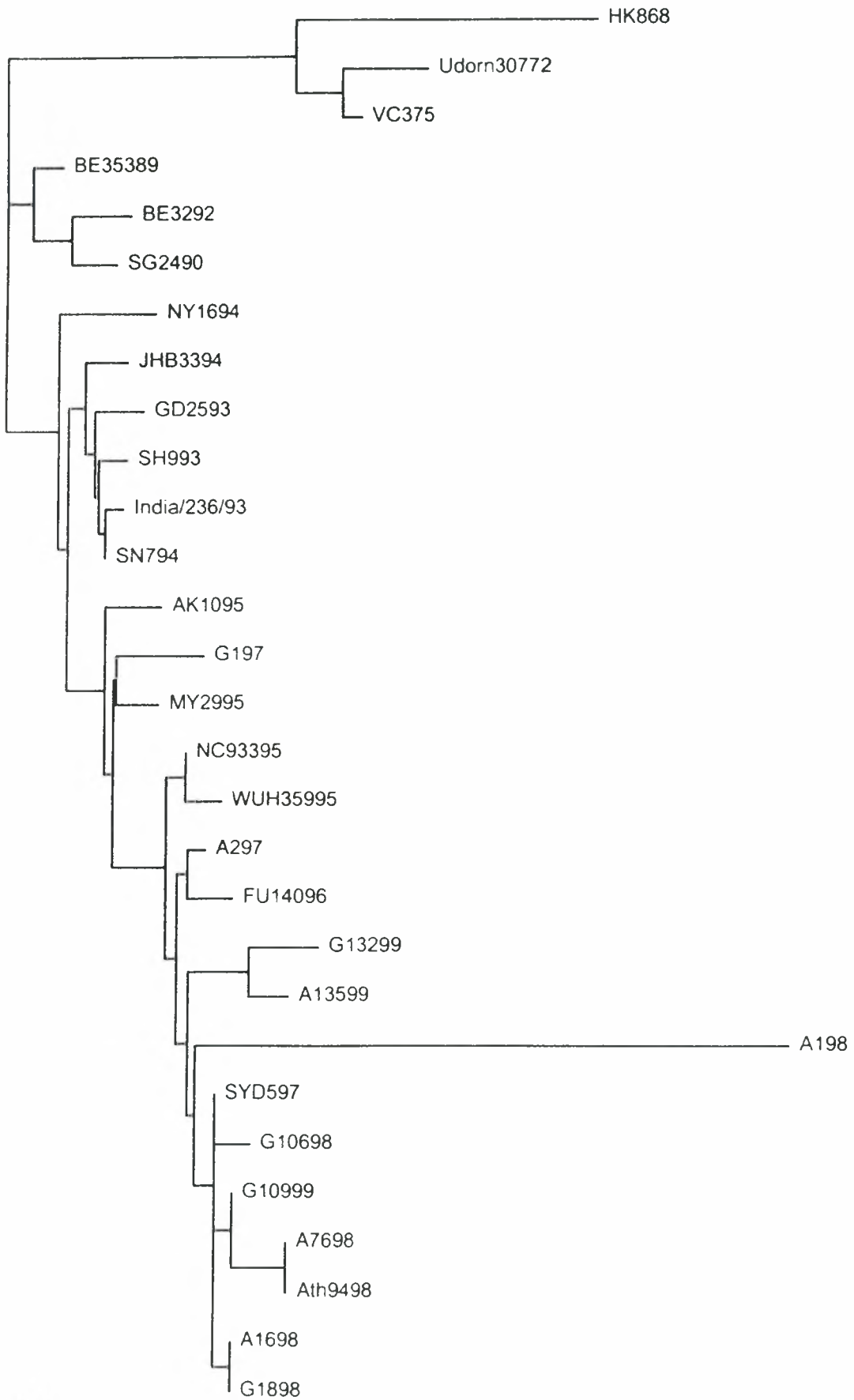
**Ομάδα 2:** A/Sydney/5/97 προσομοιάζουν αλλαγές  
Θέσεις: Ser 43, Asp 127, Asp 198, Lys 221,  
His 336, Phe 370 και Glu 381

Στελέχη: A297, A198, A1698, G1898  
A7698, A9498, G10699, G10999, G13299  
και A13599

**Εικόνα 1.** Φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του τμήματος HA1 της αιμοσυγκολλητίνης (HA) κλινικών και στελεχών αναφοράς ιών γρίπης τύπου Α (H3N2), βασισμένη στην μέθοδο neighbor-joining.



**Εικόνα 2.** Φυλογενετική ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου της νευραμινιδάσης (NA) κλινικών και στελεχών αναφοράς ιών γρίπης τύπου Α (H3N2), βασισμένη στην μέθοδο neighbor-joining.



0.01



■ Αλληλουχία αμινοξέων του τμήματος HA1 των κλινικών στελεχών γρίπης A (H3N2) .

	10	20	30	40	50	60
<b>SYD597</b>	<b>QKIPGNDNSTATLCLGHHA VENGTLVKITITNDQIEV TNATELVQSSSTGRICDSPHRILD</b>					
JHB3394	L				P	
WUH35995	L					
NC93395	L					
G197	L					
A9498					G	Q
A1698	L					
G798	L					
G1098	L					
G1998	L					
G10698	L	M				
G10999	L					
G1898	L					
G10398	L					
A7698	L					
G13299	L			S		
A13599	L		S			
A198	L					
A298	L					
A2397	L					
A297	L					
G497	L					

	70	80	90	100	110	120
<b>SYD597</b>	<b>GENCTLIDALLGDPHCDGFQNK EWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLF</b>					
WUH35995	K					
NC93395	K					
JHB3394	K					
G197	K		T			
A9498	K		T			
A1698						
G798						
G1098						
G1998						
G10698						
G10999						
G1898						
G10398		K				
A7698		K				
G13299						
A13599						
A198	K	D				
A298	K	D				
A2397	K	D				
A297	K	D				
G497	K	D				

130 140 150 160 170 180  
 SYD597 NNESEFNWTGVAQNGTSYACKRSSIKSFFSRLNWLHQLKYKYPALNVTMPNNDKFDKLYIW

WUH35995	T G	D		G V		K E	
NC93395	T G	D		G V		K E	
JHB3394	I N	D K		G V		K E	G
G197	TK G	D		G VN	K E		
A9498	TK G	D		G V		K E	
A1698			S	R			
G798			S	R			
G1098			S	R			
G1998		S		R			
G10698		S		R			
G10999		S		R			
G1898			S	R			
G10398				R			
A7698				R			
G13299		F		R			
A13599		F		R			
A198				R V		K E	
A298				R V		K E	
A2397				R V		K E	
A297				R V		K E	
G497				R V		K E	

190 200 210 220 230 240  
 SYD597 GVHHPSTSDSQTSIYAQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVRGISSRISIWTVKPG

WUH35995				V			
NC93395	V	L V					
JHB3394			L VR		D Y	Q	
G197		V			V		
A9498			L V				V
A1698			L T				
G798			L T				
G1098			L T				
G1998			L T				
G10698			L T				V
G10999			L T				V
G1898				T			V I
G10398			L				V
A7698			L				V
G13299			L				V
A13599			L				V
A198			V V				V
A298			V V				V
A2397	I		L V				V
A297			L V				V
G497			L V				

250 260 270 280 290 300  
 SYD597 DILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRI

WUH35995 N  
 NC93395 N  
 JHB3394 N N S  
 G197 DN  
 A9498 DN  
 A1698 S  
 G798 S  
 G1098 S  
 G1998 S  
 G10698  
 G10999  
 G1898  
 G10398 D  
 A7698 D  
 G13299 K  
 A13599 G  
 A198 N  
 A298 N  
 A2397 N  
 A297 L N  
 G497 S N

310 320  
 SYD597 TYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQ

WUH35995  
 NC93395  
 JHB3394  
 G197  
 A9498  
 A1698  
 G798  
 G1098  
 G1998 P  
 G10698  
 G10999  
 G1898  
 G10398 E IK  
 A7698  
 G13299 V  
 A13599  
 A198  
 A298  
 A2397  
 A297  
 G497

■ Αλληλουχία αμινοξέων του τμήματος HA1 των κλινικών στελεχών γρίπης Α (H3N2).

	10	20	30	40	50	60
<b>SYD597</b>	<b>QKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIITNDQIEVNTNATELVQSSSTGRICDSPHRILD</b>					
JHB3394	L				P	
WUH35995	L					
NC93395	L					
G197	L					
A9498					G	Q
A1698	L					
G798	L					
G1098	L					
G1998	L					
G10698	L	M				
G10999	L					
G1898	L					
G10398	L					
A7698	L					
G13299	L			S		
A13599	L		S			
A198	L					
A298	L					
A2397	L					
A297	L					
G497	L					

	70	80	90	100	110	120
<b>SYD597</b>	<b>GENCTLIDALLGDPHCDGFQNKEWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF</b>					
WUH35995	K					
NC93395	K					
JHB3394	K					
G197	K		T			
A9498	K		T			
A1698						
G798						
G1098						
G1998						
G10698						
G10999						
G1898						
G10398		K				
A7698		K				
G13299						
A13599						
A198	K	D				
A298	K	D				
A2397	K	D				
A297	K	D				
G497	K	D				

130 140 150 160 170 180  
**SYD597** N N E S F N W T G V A Q N G T S Y A C K R S S I K S F F S R L N W L H Q L K Y K Y P A L N V T M P N N D K F D K L Y I W

WUH35995	T G	D	G V	K E	
NC93395	T G	D	G V	K E	
JHB3394	I N	D K	G V	K E	G
G197	TK G	D	G V N	K E	
A9498	TK G	D	G V	K E	
A1698			S R		
G798			S R		
G1098			S R		
G1998		S	R		
G10698		S	R		
G10999		S	R		
G1898			S R		
G10398			R		
A7698			R		
G13299		F	R		
A13599		F	R		
A198			R V	K E	
A298			R V	K E	
A2397			R V	K E	
A297			R V	K E	
G497			R V	K E	

190 200 210 220 230 240  
**SYD597** G V H H P S T D S D Q T S I Y A Q A S G R V T V S T K R S Q O T V I P N I G S R P W V R G I S S R I S I Y W T I V K P G

WUH35995			V		
NC93395	V	L V			
JHB3394			L V R	D Y Q	
G197		V		V	
A9498			L V		V
A1698			L T		
G798			L T		
G1098			L T		
G1998			L T		
G10698			L T		V
G10999			L T		V
G1898			T		V I
G10398			L		V
A7698			L		V
G13299			L		V
A13599			L		V
A198			V V		V
A298			V V		V
A2397	I		L V		V
A297			L V		V
G497			L V		

250 260 270 280 290 300  
**SYD597** **DILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRI**

WUH35995  
 NC93395  
 JHB3394  
 G197  
 A9498  
 A1698  
 G798  
 G1098  
 G1998  
 G10698  
 G10999  
 G1898  
 G10398  
 A7698  
 G13299  
 A13599  
 A198  
 A298  
 A2397  
 A297  
 G497

N  
 N  
 N S  
 DN  
 DN  
 S  
 S  
 S  
 S  
 D  
 D  
 K  
 G  
 N  
 N  
 N  
 N  
 L  
 S N

310 320  
**SYD597** **TYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQ**

WUH35995  
 NC93395  
 JHB3394  
 G197  
 A9498  
 A1698  
 G798  
 G1098  
 G1998  
 G10698  
 G10999  
 G1898  
 G10398  
 A7698  
 G13299  
 A13599  
 A198  
 A298  
 A2397  
 A297  
 G497

P  
 E IK  
 V



■ Αλληλουχία αμινοξέων του γονιδίου NA των κλινικών στελεχών γρίπης A(H3N2).

	20	30	40	50	60
<b>SYD597</b>	<b>IGSVSLTIATICFLMQIAILVTTVTLHFKQYECSSPPNNQVMLCEPTIERNITEIVY</b>				
NC93395				<b>N</b>	
WUH35995				<b>N</b>	
JHB3394				<b>N</b>	
G197	<b>T</b>		<b>I</b>	<b>C</b>	<b>N</b>
A297					<b>N</b>
A1698					
G1898					
A7698					
A9498					
G10999					
G10698					
G13299				<b>N</b>	
A13599				<b>N</b>	
A198				<b>N</b>	

	70	80	90	100	110	120
<b>SYD597</b>	<b>LTNTTIEKEICPKLAEYRNWSKPQCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPD</b>					
NC93395						
WUH35995				<b>M</b>		<b>H</b>
JHB3394		<b>E</b>				<b>G</b>
G197						<b>G</b>
A297						
A1698						
G1898						
A7698		<b>K</b>				
A9498		<b>K</b>				
G10999		<b>K</b>				
G10698					<b>A</b>	
G13299						
A13599						
A198						

130 140 150 160 170 180  
**SYD597** **KCYQFALGQGTTLNRRHSNDTVHVRTPYRLLMNELGVPFHLGTKQVCIWSSSSCHDGK**

NC93395 L P  
 WUH35995 L P  
 JHB3394  
 G197  
 A297  
 A1698  
 G1898  
 A7698  
 A9498  
 G10999  
 G10698 Y  
 G13299  
 A13599  
 A198

190 200 210 220 230 240  
**SYD597** **AWLHVCVTGHDENATASFIYDGRLVDSIGSWSKKILRTQESECVCINGTCTVVMTDGSAS**

NC93395  
 WUH35995  
 JHB3394 N  
 G197 N  
 A297  
 A1698  
 G1898  
 A7698 N  
 A9498 N  
 G10999  
 G10698  
 G13299  
 A13599  
 A198

250 260 270 280 290 300  
**SYD597** **GRADTKILFIEEGKIVHISPLSGSAQHVEECSCYPRYPGVRCVCRDNWKGSNRPVDINV**

NC93395 S  
 WUH35995 S  
 JHB3394 E  
 G197  
 A297 L  
 A1698  
 G1898  
 A7698  
 A9498  
 G10999  
 G10698  
 G13299 T K R  
 A13599 T K RP  
 A198 L

310 320 330 340 350 360  
**SYD597 KDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDS SSSSHCLNPNNEEGGHGVKGWAFDDGNDVWVGRTIS**

NC93395  
 WUH35995  
 JHB3394  
 G197  
 A297  
 A1698  
 G1898  
 A7698  
 A9498  
 G10999  
 G10698  
 G13299  
 A13599  
 A198

Y  
 Y D

370 380 390 400 410 420  
**SYD597 EKFRSGYETFKVIEGWSKPNKLGQINRQVIVDRGNRSGYSGIFSVVEGKSCINRCFYVELI**

NC93395  
 WUH35995  
 JHB3394  
 G197  
 A297  
 A1698  
 G1898  
 A7698  
 A9498  
 G10999  
 G10698  
 G13299  
 A13599  
 A198

L G  
 L G  
 EL G S  
 L G  
 L  
 G  
 G  
 E R  
 E R  
 NS E M  
 S E M  
 L FD

430 440 450  
**SYD597 RGRKQETEVWWTNSNSIVVFCGTS GTYG**

NC93395  
 WUH35995  
 JHB3394  
 G197  
 A297  
 A1698  
 G1898  
 A7698  
 A9498  
 G10999  
 G10698  
 G13299  
 A13599  
 A198

**K KETGNSLVDLKQYCC LWHLRYIWN**



## ► ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι περισσότερες διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συχνά στο κλινικό εργαστήριο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών γρίπης τύπου Α και τύπου Β, όπως ανοσοενζυμικές (ELISA) και ανοσοφθορισμός (IF), απαιτούν υψηλή συγκέντρωση αντιγόνων στο κλινικό δείγμα για αξιόπιστη και ευαίσθητη διάγνωση με υψηλή ειδικότητα. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR), η παραλλαγές αυτής, προσφέρουν σημαντικά αυξημένη ευαισθησία για ανίχνευση, τυποποίηση και υποτυποποίηση ιών γρίπης. Οι μοριακές τεχνικές διαθέτουν την ικανότητα να ανιχνεύουν ιό γρίπης απ'ευθείας στο κλινικό δείγμα, με μεγάλη ευαισθησία, χωρίς να είναι πρώτα απαραίτητη η καλλιέργεια του ιού σε εμβρυοφόρα αυγά ή σε κυτταροκαλλιέργειες. Σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες, η RT-PCR και άλλες μοριακές τεχνικές, προσφέρουν σημαντικά αυξημένη ευαισθησία έναντι των μεθόδων που βασίζονται στην ανοσοενζυμική αντίδραση και τον ανοσοφθορισμό. Αυτή η υπεροχή συνεισφέρει στην σωστή και έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και εφαρμογή τέτοιων μεθόδων στο κλινικό εργαστήριο ή σε κέντρα αναφοράς γρίπης, μπορεί να επιδράσει στον έλεγχο επιδημιών, στην μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας και του κοινωνικο-οικονομικού κόστους, που συνεπάγεται ως αποτέλεσμα των ετήσιων επιδημιών γρίπης και άλλων ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού.

Προσφέρουν την δυνατότητα ταυτοποίησης και περαιτέρω μελέτης σε μοριακό επίπεδο ιών γρίπης του ανθρώπου, με μέγιστη ευαισθησία. Η συνεισφορά τους στην πρόληψη, θεραπεία, έλεγχο και επιδημιολογική μελέτη της γρίπης είναι σημαντική.

Επίσης αυτές οι τεχνικές μπορούν να προσφέρουν στην επιδημιολογική μελέτη της γρίπης.

Ενα μειονέκτημα της RT-PCR, είναι η δυνατότητα επιμόλυνσης, ειδικά στην περίπτωση που εφαρμόζεται nested πρωτόκολλο. Στην παρούσα διατριβή, η RT-PCR εφαρμόζεται σαν μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης, καθώς και περαιτέρω μελέτης της γενετικής μεταβλητότητας των ιών γρίπης του ανθρώπου. Σε σύγκριση με την ταχεία μέθοδο Immunocapture-ELISA (IC-ELISA) και την καλλιέργεια, η RT-PCR ανίχνευσε τέσσερα επιπλέον θετικά στην γρίπη Α κλινικά δείγματα, απ' ότι η μέθοδος αναφοράς. Αυτή η διαφορά στον αριθμό των θετικών δειγμάτων, πιθανώς να οφείλεται και στην παρουσία αδρανοποιημένου ιού στα κλινικά δείγματα, και ως συνέπεια μη-ανιχνεύσιμου με την μέθοδο της καλλιέργειας. Αυτή η αδρανοποίηση του ιού είναι συνέπεια της μακροπρόθεσμης φύλαξης των κλινικών δειγμάτων σε μη ιδανικές θερμοκρασίες. Σε σύγκριση με την Immunocapture-ELISA, η RT-PCR είχε ανώτερη ευαισθησία. Η RT-PCR είχε πλήρη ταυτοποίηση με την μέθοδο αναφοράς στον αριθμό ανίχνευσης θετικών δειγμάτων στην γρίπη Α και Β. Η IC-ELISA ανίχνευσε 17 ιούς γρίπης στα αρχικά κλινικά δείγματα, σε σύγκριση με 29 θετικά με την RT-PCR και 25 στα καλλιεργειμένα δείγματα, 24 απο τα οποία ταυτοποιήθηκαν σαν θετικά στην γρίπη Α και Β με την μέθοδο αναφοράς. Η αύξηση της ευαισθησίας με την IC-ELISA, κατόπιν καλλιέργειας, αποδεικνύει την απ'ευθείας εξάρτηση της μεθόδου αυτής στον τίτλο του ιού. Με την IC-ELISA, ανιχνεύτηκε ένα θετικό στην γρίπη δείγμα το οποίο ήταν θετικό και με την RT-PCR, αλλά αρνητικό κατόπιν καλλιέργειας σε εμβρυοφόρα αυγά.

Συμπερασματικά, η RT-PCR, όταν χρησιμοποιείται σαν ταχεία μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης ιών γρίπης τύπου Α και τύπου Β του ανθρώπου σε κλινικά

δείγματα, προσφέρει μέγιστη ευαισθησία, ειδικότητα και θετική διαγνωστική αξία, έναντι της IC-ELISA. Επίσης, η PCR μπορεί να ανιχνεύσει θετικά στην γρίπη δείγματα, ακόμη και στην περίπτωση που ο ιός είναι αδρανοποιημένος. Στα πλαίσια της επίβλεψης της γρίπης και στο κλινικό εργαστήριο, μια ταχεία μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης με μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα, συνεισφέρει σημαντικά στην σωστή διάγνωση και θεραπεία της γρίπης και άλλων ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού, τον καλύτερο έλεγχο επιδημιών, την μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας ανάμεσα στα άτομα υψηλού κινδύνου και στην πληρέστερη επιδημιολογική μελέτη της γρίπης και άλλων ιών του αναπνευστικού. Με την RT-PCR, είναι δυνατή η διαφοροποίηση της γρίπης από άλλους ιούς που προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού σε άτομα όλων των ηλικιών, η ανίχνευση και ταυτοποίηση μικτών λοιμώξεων και η ταυτόχρονη υποτυποποίηση του ιού. Η συνεχής εξέλιξη των επιφανειακών αντιγόνων της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (NA) των ιών της γρίπης μέσω των μηχανισμών της ελλάσσωνος και μείζωνος αντιγονικής μεταβολής, εμπλέκεται στον επιδημικό χαρακτήρα των ιών της γρίπης. Ο αποτελεσματικότερος έλεγχος της ετήσιας επίβλεψης της γρίπης απαιτεί ετήσια επίβλεψη των μοριακών αλλαγών στα γονίδια HA (HA1) και NA και συγκεκριμένα στις κύριες αντιγονικές θέσεις αυτών. Πέραν της αντιγονικής μελέτης επιδημικών στελεχών γρίπης, η ανάλυση της αλληλουχίας των ανωτέρω γονιδίων σε επίπεδο αμινοξέων αποτελεί την πλέον ευαίσθητη μέθοδο εξακρίβωσης του βαθμού μετάλλαξης του ιού. Η εφαρμογή της τεχνικής εξακρίβωσης των αλληλουχιών (DNA sequencing) σε συνδυασμό με την τεχνική RT-PCR (RT-PCR-DNA sequencing), δίνει την δυνατότητα για περαιτέρω μελέτη, στο μοριακό επίπεδο (αλληλουχία αμινοξέων), της γενετικής μεταβλητότητας των γονιδίων HA και NA της γρίπης.



Τέτοιες πληροφορίες σχετικά με την γενετική μεταβλητότητα του κάθε στελέχους ιού γρίπης, προσφέρει πληροφορίες για την επιδημική δυνατότητα του ιού, τον πιθανό βαθμό αντιγονικής μεταβλητότητας που έχει υποστεί και την εξελικτική πορεία των στελεχών του ιού που προκύπτει με την φυλογενετική ανάλυση. Με την μέθοδο εξακρίβωσης της αλληλουχίας, γίνεται γνωστή η αλλαγή στις θέσεις 'κλειδιά' πάνω στα εξωτερικά αντιγόνα του ιού, οι οποίες γίνονται στόχοι της ανοσολογικής αντίδρασης (εξουδετερωτικά αντισώματα) του οργανισμού. Σημειακές μεταλλάξεις στις αντιγονικές θέσεις της HA, ευθύνονται για αλλαγές στην αντιγονικότητα και μολυσματική ικανότητα του ιού, στην ικανότητα αναγνώρισης του κυτταρικού υποδοχέα και στο φαινόμενο της αιμοσυγκόλλησης ερυθρών κυττάρων από διάφορα είδη ζώων. Ειδικά στους ιούς τύπου A και υποτύπου H3, η ικανότητα αυτή επηρεάζεται από αλλαγές στις θέσεις αμινοξέων 186 και 226 που βρίσκονται στο τμήμα HA1 του γονιδίου της HA. Οι αλλαγές αυτές συχνά επηρεάζουν τον φαινότυπο του ιού, επηρεάζοντας την επιδημική δυνατότητα ενός στελέχους.

Οι θέσεις 186 και 226 βρίσκονται μέσα στην περιοχή της HA1 όπου εφάπτεται ο κυτταρικός υποδοχέας (receptor-binding site). Η HA (HA1) σε σύγκριση με την NA παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης, λόγω της ανοσολογικής πίεσης που δέχεται, τυχαίων μεταλλάξεων και προσαρμογής στα αυγά. Αλλαγές αμινοξέων στις θέσεις 186, 194 και 226, επηρεάζουν την ειδικότητα της HA προς τον κυτταρικό υποδοχέα και την αιμοσυγκολλητική ιδιότητα της γρίπης. Επιδημικά στελέχη γρίπης συνήθως παρουσιάζουν αλλαγές στις θέσεις 194 και 226. Λόγω της παρουσίας της γρίπης A σε πολλά είδη ζώων, η HA παρουσιάζει ειδικότητα για τον κάθε κυτταρικό υποδοχέα (π.χ. H3 πτηνού, H3 χοίρου και H3 ανθρώπου). Η πλειοψηφία των στελεχών γρίπης A (H3N2) που μελετήθηκε με RT-PCR-sequencing, παρουσίασε τέτοιες αλλαγές.

Πολλαπλά περάσματα των αρχικών δειγμάτων σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, επηρεάζουν την δομή της HA. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται προσαρμοστικές μεταλλάξεις στο τμήμα HA1 και στις θέσεις 186 και 226. Η μοριακή μέθοδος RT-PCR-sequencing παρέχει ανώτατη ευαισθησία σε σύγκριση με τις μοριακές τεχνικές PCR-RFLP, PCR-HMA και PCR-SSCP. Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των επιδημικών στελεχών γρίπης A (H3N2) αποκάλυψε την χαμηλότερη γενετική ποικιλομορφία της NA σε σύγκριση με την HA, (αριθμός θέσεων με σημειακές μεταλλάξεις και συνολικός αριθμός στελεχών που παρουσίασαν αλλαγές). Αυτό οφείλεται στο ότι η NA αντιδρά διαφορετικά στην ανοσολογική πίεση. Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση επίσης αποκάλυψε ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος γρίπης με HA που προσομοίαζε παλαιότερο επιδημικό στέλεχος A/Wuhan/359/95 και NA όμοια με αυτήν στελεχών τύπου A/Sydney/5/97.

Ο ανασυνδυασμός αυτός συνήθως συμβαίνει όταν στελέχη γρίπης που κυκλοφορούν την ίδια η διαφορετική χρονική περίοδο μολύνουν τον οργανισμό σε μορφή μικτών λοιμώξεων. Η κλινική σπουδαιότητα του αντιγόνου HA στον έλεγχο της γρίπης είναι γνωστή. Η μοριακή ανάλυση της HA (HA1), πέραν της ταυτοποίησης με μοριακές τεχνικές, συνεισφέρει στον πιο αποτελεσματικό έλεγχο επιδημιών προσφέροντας πληροφορίες για την δομή και λειτουργία του ιού. Πρόσφατες μέletes της δομής της NA αποτελέσαν βάση για την δημιουργία πιο αποτελεσματικών αντι-ικών ουσιών με στόχο την NA.

Όπως προκύπτει και απο έρευνα με την χρήση υπολογιστών σε τράπεζα δεδομένων με καταχωρημένες αλληλουχίες ιών γρίπης σε παγκόσμια κλίμακα, οι καταχωρήσεις στην γονιδιακή τράπεζα (Genbank) με αριθμούς πρόσβασης (accession numbers): AF 315567-AF 315571, AF 316817-AF 316821, AF 315559-AF 315566, AF

316811- AF 316816 και AF 316805- AF 316810, που προέκυψαν απο την παρούσα μελέτη, αποτελούν τις πρώτες καταχωρήσεις ιών γρίπης τύπου A (H3N2) που απομονώθηκαν στην χώρα μας. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν συνεπώς πρωτεύων σημείο αναφοράς για τον μελλοντικό έλεγχο των ρυθμών μεταβολής των πληθυσμών των ιών γρίπης A (H3N2) στην Ελλάδα, που σύντομα πρόκειται να εμπλουτιστούν και με ανάλογα δεδομένα ελληνικών στελεχών ιών γρίπης τύπου B και τύπου C που έχουμε ήδη απομονώσει.

## ► ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lamb RA, Krug RM (1996). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.  
  
In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Virology. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp1353-1395.
2. Murphy FA (1996). Virus taxonomy. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Virology. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp15-57.
3. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988).  
  
Structure of influenza haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid.  
  
Nature 333:426-431.
4. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ (1981). Structural identification of the antibody-binding sites of Hong-Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation, Nature 289:373-378.
5. Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9A resolution. Nature 303:35-40.
6. Cox NJ, Subbarao K (1999). Influenza. Lancet 354:1277-1282.

7. Steinhauer DA (1999). Role of the hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258:1-20.
8. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol rev* 56:152-179.
9. Shope RE (1931). Swine influenza 1. Experimental transmission and pathology. *Journal of experimental medicine*. 54:349-360.
10. Smith W, Andrews CH, Laidlaw PP (1933). A virus from influenza patient. *Lancet*, ii 666-668.
11. Smith W, Stuart-Harris CH (1936). Influenza infection of man from the ferret. *Lancet* ii 121-123.
12. Wiley DC, Skehel JJ (1987). The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann Rev Biochem* 56:365-394.
13. Strauss JH, Strauss EG (1988). Evolution of RNA viruses. *Ann Rev Microbiol* 42: 666-699.
14. Taylor RM (1949). Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants. *Am J public health* 39:171-178.

15. Wilson IA, Cox NJ (1990). Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Ann rev Immunol* 8:737-771.
16. Elton D, Medcalf L, Bishop K, Harrison D, Digard P (1999). Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* 73:7357-7367.
17. Sprenger MJW, Mulder PGH, Beyer WEP, Van Strik R, Masurel N (1993).  
Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease,  
1967-1989. *Int J Epidemiol* 22:334-340.
18. Cate TR (1987). Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am J Med* 82:15-19.
19. Monto AS (1997). Prospects for pandemic influenza control with currently available vaccines and antivirals. *J Infect Dis* 176:32-37.
20. Hayashida H, Toh H, Kikuno R, Miyata T (1985). Evolution of influenza virus genes. *Molecular biology and evolution* 2:289-309.
21. Buonagurio DA, Nakada S, Fitch WM, Palese P (1986). Epidemiology of influenza C in man: multiple evolutionary lineages and low rate of change. *Virology* 153:12-21.
22. Buonagurio DA, Nakada S, Parvin JD, Krystal M, Palese P, Fitch WM (1986). Evolution of human influenza A viruses over 50 years: rapid, uniform rate of change in NS gene. *Science* 232:980-982.

23. Barker WH, Mullody JP (1982). Pneumonia and influenza deaths during epidemics: implications for prevention. *Arch Intern Med* 142: 85-89.
24. Nicholson KG (1998). Human influenza. In: Nicholson KG, Hay AJ, Webster RG, eds. *Textbook of influenza*. Boston: Blackwell Science 222-290.
25. Monto AS, Robinson DP, Herlocker ML, Hirson JM, Elliot MJ, Chrisp A (1999). Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 282:31-35.
26. Hayden FG, Osterhaus ADME, Treanor JJ (1997). Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. *N Engl J Med* 337:874-880.
27. Besselaar TG, Schoub BD, Blackburn NK (1999). Impact of the introduction of A/Sydney/5/97 H3N2 influenza virus into South Africa. *J Med Virol* 59:561-568.
28. Fleming DM, Cross KW (1993). Respiratory syncytial virus or influenza? *Lancet* 342:8886-8887.
29. Couch RB (2000). Prevention and treatment of influenza. *N Engl J Med* 343:1778-1787.
30. McCullers JA, Facchini S, Chesney PJ, Webster RG (1999). Influenza B virus encephalitis. *Clin Infect Dis* 28:898-900.
31. Both GW, Sleigh MJ, Cox NJ, Kendal AP (1983). Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 48:52-60.



32. Lina B, Valette M, Forey S, Stagnara J, See DM, Aymard M (1996). Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alps (France) during winter 1994 to 1995. *J Clin Microbiol* 34:3007-3011.
33. Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC (1997). Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 35:2076-2082.
34. Hannoun C (1994). Europe preparing to face an influenza pandemic. *Eur J Epidemiol* 10:449-450.
35. Cox NJ, Brammer TL, Regnery HL (1994). Influenza: Global surveillance for epidemic and pandemic variants. *Eur J Epidemiol* 10:467-470.
36. Kilbourne DE, Johansson BE, Grajower B (1990). Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:786-790.
37. Spada B, Bielher K, Chegas P, Keye J, Riepenhoff-Talty M (1991). Comparison of rapid immunofluorescence to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and adults. *J Virol Methods* 33:305-310.
38. Chomel JJ, Thouvenot D, Onno M, Kaiser C, Gourreau JM, Aymard M (1989). Rapid diagnosis of influenza infection of NP antigen using an immunocapture ELISA test. *J Virol Methods* 25:81-91.
39. Duverlie G, Houbart L, Visse B (1992). A nylon membrane enzyme immunoassay for rapid diagnosis of influenza A infection. *J Virol Methods* 40:77-84.

40. Claas ECJ, van Milaan AJ, Sprenger MJW (1993). Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infections in respiratory samples from a children's hospital. *J Clin Microbiol* 31:2218-2221.
41. Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan T, Weber JM (1995). Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 33:1180-1184.
42. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC (1998). Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 36:2990-2995.
43. Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karren RA, Yolken RH (1994). Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol* 32:623-628.
44. Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH (1996). Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 43:2604-2606.
45. Zhang W, Evans DH (1991). Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 33:165-189.
46. Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B (1999). Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 59:215-220.

47. Pregliasco F, Mensi C, camorali L, Anselmi G (1998). Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* 56:168-173.
48. Chomel JJ, Remilleux MF, Marchand P, Aymard M (1992). Rapid diagnosis of influenza A. Comparison with ELISA immunocapture and culture. *J Virol Methods* 37:337-344.
49. Zou S (1997). A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. *J Clin Microbiol* 35:2623-2627.
50. Zou S, Stansfield C, Bridge J (1998). Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription PCR and the heteroduplex mobility assay. *J Clin Microbiol* 36:1544-1548.
51. Webster RG, Rott R (1987). Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell* 50:665-666.
52. Rebello-de-Andrade H, Zambon MC (2000). Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. *Epidemiol Infect* 124:515-522.
53. Cha TA, Jhao J, Lane E, Murray MA, Stec DS (1997). Determination of the genome composition of influenza virus reassortants using RT-PCR, followed by fluorescence single-strand conformation analysis. *Anal Biochem* 252:24-32.
54. Kwok S, Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:273-238.
55. Pisareva M, Bechtereva T, Plyusnin A, Dobretsova A, Kisselev O (1992). PCR amplification of influenza A virus specific sequences. *Arch Virol* 125: 313-318.

56. Yamada AJ, Imanashi E, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S (1991). Detection of influenza viruses in throat swabs by using PCR. *Microbiol Immunol* 35:259-265.
57. Bressoud A, Whitcomb J, Pourzand C, Haller O, Cerruti P (1990). Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 167:425-430.
58. Francis TJ (1940). A new type of virus from epidemic influenza. *Science* 92:405-408.
59. Donofrio JC, Coonrod JD, Davidson JN, Betts RF (1992). Detection of influenza A and B in respiratory secretions with the polymerase chain reaction. *PCR Method Appl* 1:263-268.
60. Leonardi GP, Leib H, Birkhead GS, Smith C, Costello P, Conron W (1994). Comparison of rapid detection methods for influenza A virus and their value in health-care management of institutionalized geriatric patients. *J Clin Microbiol* 32:70-74.
61. Chomel JJ, Pardon D, Thouvenot D, Allard JP, Aymard M (1991). Comparison between three rapid methods for direct diagnosis of influenza and the conventional isolation procedure. *Biologicals* 19:287-292.
62. Sizun J (1998). Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J Virol Methods* 72:145-152.

63. Ellis JS, Sadler CJ, Laidler P, Rebelo de Andrade H, Zambon MC (1997). Analysis of influenza A H3N2 strains isolated in England during 1995-1996 using polymerase chain reaction restriction. *J Med Virol* 51:234-241.
64. Wallace LA, McAulay KA, Douglas JD, Elder AG, Stott DJ, Carmen WF (1999). Influenza diagnosis: from dark isolation into the molecular light. West of Scotland respiratory virus study group. *J Infect* 39:221-226.
65. Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harriw RJ (1992). Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification 30:901-904.
66. Hirsila M, Kauppila J, Tuomaala K, Grekula B, Puhakka T, Ruuskanen O, Ziegler T (2001). Detection by reverse transcription-polymerase chain reaction of influenza nasopharyngeal secretions of adults with a common cold. *J Infect Dis* 183:1269-1272.
67. Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM (2001). Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PC. *J Clin Microbiol* 39:196-200.
68. Hermann B, Larsson C, Zwegberg BW (2001). Simultaneous detection and typing of influenza A and B by a nested RT-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 39:134-138.
69. Li J, Chen S, Evans DH (2001). Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and RT-PCR. *J Clin Microbiol* 39:696-704.

70. Sakamoto S, Kino Y, Oka T, Herlocher ML, Maassab F (1996). Gene analysis of reassortant influenza virus by RT-PCR followed by restriction enzyme digestion. *J Virol Methods* 56:161-171.
71. Boivin G, Hardy I, Kress A (2001). Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLUOIA). Comparison with cell-culture and RT-PCR. *J Clin Microbiol* 39:730-732.
72. Vabret A, Sapin G, Lezin B, Mosnier A, Chen J, Barnouf L, Petitjean J, Gouarin S (2000). Comparison of three non-nested RT-PCR for the detection of influenza. *J Clin Virol* 17:167-175.
73. Mori I, Nagafuji H, Matsumoto K, Kimura Y (1997). Use of polymerase chain reaction for demonstration of influenza virus dissemination in children. *Clin Infect Dis* 24:736-737.
74. Hardy I, Li Y, Coulthart MB, Govette N, Boivin G (2001). Molecular evolution of influenza A/H3N2 viruses in the province of Quebec during the 1997-2000 period. *Virus Res* 77:89-96.
75. Ellis JS, Chakaverty P, Clewley JP (1995). Genetic and antigenic variation in the haemagglutinin of recently circulating human A (H3N2) viruses in the United Kingdom. *Arch Virol* 140:1889-1904.
76. Katz JM, Naeve CW, Webster RG (1987). Host-cell mediated variation in H3N2 viruses. *Virology* 156:386-395.
77. Rogers GN, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1983). Single amino acid

substitutions in influenza HA change receptor binding specificity. *Nature* 304:76-78.

78. Vines A, Wells K, Mastrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y (1998). The role of influenza virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* 72:7626-7631.
79. Meyer WJ, Wood JM, Major D, Robertson JS, Webster RG, Katz JM (1993). Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 196: 130-137.
80. Katz JM, Webster RG (1988). Antigenic and structural characterization of multiple subpopulations of H3N2 influenza virus from an individual. *Virology* 165:446-456.
81. Katz JM, Wang M, Webster RG (1990). Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 64:1808-1811.
82. Katz JM, Webster RG (1992). Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells. *J Gen Virol* 73:1159-1165.
83. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205:17-23.



84. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nerome R, Omoe K, Sugita S, Yamazaki Y, Takahashi T, Nerome K (1998). Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2) viruses from Japan: Evidence for genetic reassortment of the six internal genes. *J Virol* 72:8021-8031.
85. Rocha EP, Xu X, Hall AE, Allen JR, Regnery HL, Cox NJ (1993). Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell-and-grown viruses. *J Gen Virol* 74:2513-2518.
86. Li XS, Zhao CY, Gao HM, Zhang YQ, Ishida M, Kanegae Y, Endo A, Nerome R, Omoe K, Nerome K (1992). Origin and evolutionary characteristics of antigenic reassortant influenza A (H1N2) viruses isolated from man in China. *J Gen Virol* 73:1329-1337.
87. Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y (1992). Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227:493-499.
88. Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ (1997). Long term trends in the evolution of H (3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7712-7718.
89. Phyhala R, Ikonen N, Forsten T, Akano S, Kinnunen L (1995). Evolution of the HA1 domain of human influenza A (H1N1) virus: loss of glycosylation sites and occurrence of herald and conserved strains. *J Gen Virol* 76:205-210.
90. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* 8:189-191.

91. Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
92. Besselaar TG, Blackburn NK, Schoub BD (1996). The molecular characterization of influenza virus isolated in South Africa during 1993 and 1994. *Res Virol* 147:239-245.
93. Valassina M, Cuppone AM, Cusi MG, Valensin PE (1997). Rapid detection of different RNA respiratory virus species by multiplex PCR, application to clinical specimens. *Clin Diagn Virol* 8:227-232.
94. Grondahl B, Wolfram P, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JAI, Schmitt HJ (1999). Parid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 37:1-7.
95. Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ (1998). Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 36:1388-1391.
96. Adcock PM, Stout GG, Hauck MA, Marshall GS (1997). Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. *J Pediatr Infect Dis* 16:842-846.
97. Bartlett JG, Mundy LM (1995). Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 333:1618-1624.

98. Gilbert LL, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG (1996). Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. *J Clin Microbiol* 34:140-143.
99. Wang M, Katz JM, Webster RG (1989). Extensive heterogeneity in the hemagglutinin of egg-grown influenza viruses from different patients. *Virology* 171: 275-279.
100. Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ (1997). Long term trends in the evolution of H (3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci* 94:7712-7718.
101. Robertson JS, Nicolson C, Major D, Robertson EW, Wood JM (1993). The role of amniotic passage in the egg-adaptation of human influenza virus is revealed by haemagglutinin sequence analyses. *J Gen Virol* 74:2047-2051.
102. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 230:1350-1354.
103. Bean WJ, Cox NJ, Kendal AP (1980). Recombination of human influenza A viruses in nature. *Nature* 284:638-640.
104. Hardy CT, Young SA, Webster RG, Naeve CW, Owens RJ (1995). Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 211:302-306.

105. Xu X, Cox NJ, Bender CA, Regnery HL, Shaw MW (1996). Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 224:175-183.
106. Lamb R (1989). Genes and proteins of the influenza viruses. In 'The influenza viruses' (R Krug, H Franekel-Conrat, and R Wagner, Eds), pp. 1-88. Plenum press, New York.
107. Lin YP, Wharton SA, Martin J, Skehel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA (1997). Adaptation of egg-grown and transfectant influenza viruses for growth in mammalian cells: selection of hemagglutinin mutants with elevated pH of membrane fusion. *Virology* 233:402-410.
108. Rott R, Orlich M, Klenk HD, Wang ML, Skehel JJ, Wiley DC (1984). Studies on the adaptation of influenza viruses to MDCK cells. *EMBO J* 3:3329-3332.
109. Rohm C, Zhou n, Suss J, MacKenzie J, Webster RG (1996). Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217:508-516.
110. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuji Y, Tateno Y, Nakajima K (1991). Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 182:475-485.
111. Rogers GN, Paulson JC (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127:361-373.

112. Claas ECJ, Kawaoka Y, De Jong JC, Masurel N, Webster RG (1994). Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 204:453-457.
113. Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A, Varaldo PE (1993). Quantitative PCR and RT-PCR in Virology. *PCR methods and Applications* 2:191-196.
114. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca M (1993). Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol* 31:1345-1349.
115. Staynor K, Foster G, McArthur M, mcGeer A, Petric M, Simon AE (1994). Influenza A outbreak in a nursing home: the value of early diagnosis and the use of amantadine hydrochloride. *Can J Infect Control* 9:109-111.
116. Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ (1995). Type and subtype specific detection on influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol* 33:318-321.
117. Chan CH, Wu MC, Huang CT, Wu KG, Liu WT (1999). Genetic characterization of the hemagglutinin of two strains of influenza B virus co-circulated in Taiwan. *J Med Virol* 59:208-214.
118. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW (2001). Simultaneous detection and typing

of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay. *J Clin Microbiol* 39:134-138.

119. Landry ML, Cohen S, Ferguson D (2000). Impact of sample type on rapid detection of influenza virus A by cytospin-enhanced immunofluorescence and membrane enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38:429-430.

120. Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM (2000). Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 39:196-200.

► **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



VIROLOGY

## A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A and B

ELIAS PLAKOKEFALOS<sup>\*,†</sup>, PANAYOTIS MARKOULATOS<sup>\*</sup>, EUTYCHIOS KTENAS<sup>\*</sup>, NIKI SPYROU<sup>\*</sup> and NICHOLAS C. VAMVAKOPOULOS<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>National Influenza Center, Southern Greece, Virology Department, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas Sofias Avenue, Athens 115 21, <sup>†</sup>National School of Public Health, 196 Alexandras Avenue, Athens 115 21 and

<sup>‡</sup>Department of Biology and Genetics, University of Thessaly Medical School, 22 Papakyriazi Street, Larisa 41222, Thessaly, Greece

An immunocapture (IC) ELISA and reverse transcriptase (RT)-PCR assays were evaluated as screening methods for the detection of influenza virus types A and B in clinical samples collected from individuals presenting with influenza-like symptoms in Southern Greece. Standard virus isolation in embryonated hens' eggs was taken as the reference method. According to the reference method, 25 (16.7%) of the 150 clinical samples examined were infected by influenza viruses – 19 type A (H3N2) and 6 type B. The sensitivity of immunocapture ELISA was 64% and that for RT-PCR was 100%. The specificity of IC ELISA was 98% and by RT-PCR 97%. The positive diagnostic value of IC ELISA was 94% and of RT-PCR 86%, whereas the negative diagnostic values for IC ELISA and PCR were 93% and 100%, respectively. These findings confirm that RT-PCR provides significantly increased sensitivity over IC ELISA and can be of value in the management of regional influenza screening surveys conducted by the national public health services.

### Introduction

Influenza virus types A and B have a single-stranded segmented RNA genome of negative polarity. Because of their high rate of mutation, they exhibit increased genetic and antigenic instability resulting in frequent antigenic drift, and in the case of type A, more rarely antigenic shift [1]. Influenza viruses are the primary cause of annual influenza epidemics. They constitute the most important and widespread pathogens of the upper and lower respiratory tract in man, causing high rates of morbidity and mortality world-wide, especially among the elderly and patients suffering from chronic cardiovascular and respiratory problems [2]. To ameliorate the impact of influenza epidemics, national public health services follow a rigorous influenza surveillance and vaccination policy, espe-

cially for populations at high risk [3]. However, the efficacy of vaccination depends on the specific cocktail of protective antigenicities being used to maximise coverage by the most dominant viral genotypic variants being periodically identified. This sorting process requires regular surveys of influenza activity in samples collected from patients with flu-like symptoms, which include high fever, head and muscle aches and general fatigue [4]. However, other human pathogens of the respiratory tract, including respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus types 1, 2, 3 and 4, adenoviruses and rhinoviruses, cause similar symptoms. This multitude of agents, in addition to influenza viruses, causing similar clinical symptoms, renders primary screening of influenza-positive patients a major task. Efficient control of influenza epidemics requires continuous optimisation of all aspects of vaccine development and administration including painstaking assessment of its efficacy. Effective monitoring of viral outbreaks involves the implementation of numerous screening methods of influenza activity, including virus isolation from embryonated hens' eggs and tissue culture, immunofluorescence [5, 6], enzyme immunoassays (EISA)

Date received 29 Nov 1999, revised version received 30 March 2000, accepted 6 April 2000  
Corresponding author: Dr N. Spyrou  
(e-mail: vresearch@hol.gr)

[7, 8], reverse transcriptase (RT)-PCR [9, 10], multiplex RT-PCR [6, 11] and PCR coupled to enzyme immunoassay [12, 13]. A number of investigators have evaluated most of these methods and have assessed their sensitivities, specificities, diagnostic values and false positive or negative results, in an attempt to normalise and compare the large variety of influenza surveys conducted world-wide every year [14–18].

The present study compared the performance characteristics of immunocapture (IC) ELISA and RT-PCR as screening methods for influenza virus type A and B activities. It reports the sensitivity, specificity, diagnostic value, false positive or negative results of each method in detecting and identifying influenza infection directly from the clinical specimens and after passage to embryonated hens' eggs; virus isolation was the method of reference or 'gold standard'.

## Materials and methods

### *Clinical specimens*

The 150 nasal and pharyngeal swabs or primary samples were collected from individuals with influenza-like illness, 3–4 days following the onset of symptoms. All primary samples were collected during two World Health Organization (WHO) influenza surveillance periods, from Oct. 1996 to April 1997 and from Oct. 1997 to April 1998. Patients' ages ranged from 20 days to 65 years. Specimen collections were from out-patient facilities of hospitals and private practice physicians in Southern Greece. All samples were held in 2.5 ml of virus transport medium containing (L) bacto-tryptose 24.9 g, gelatin 5 g, streptomycin 0.5 g, penicillin 500 000 U and fungizone 50 mg, at 4°C for 2 days. The swabs were removed from the vials and the clinical specimens were centrifuged at 1500 g at 4°C for 15 min. The supernates were either tested immediately, or stored at –80°C.

### *Influenza virus propagation and typing*

All primary samples and negative controls were inoculated into the amniotic (150 µl) and allantoic (150 µl) cavities of 8-day-old embryonated hens' eggs and incubated at 35°C for 3 days. Propagated samples were the primary samples that had been passed in embryonated hens' eggs. After incubation, amniotic and allantoic fluids were harvested and viral titres were determined by the haemagglutination (HA) test with chicken red blood cells 0.5%, according to standard WHO protocols. All isolates were typed by the haemagglutination-inhibition (HI) method as type A, subtype H1N1 and H3N2, or type B with antisera and guidelines provided by WHO for the surveillance of

### *Immunocapture ELISA*

The primary samples were screened by IC ELISA, and typed as influenza type A or B with monoclonal antibodies (MAbs) raised against the respective viral nucleoproteins. ELISA microplates (Greiner Laboratories, Germany) were coated (100 µl/well) with solutions of polyclonal antibodies raised in rabbits against influenza type A or B specific antigens (kindly provided by Professor S. van der Werf, Institut Pasteur, Paris, France), which had been diluted 1 in 6000 in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Polyclonal antibodies were adsorbed to plastic surface at 4°C overnight. After each step of the IC ELISA, plates were washed five times with phosphate-buffered saline (PBS) containing Tween-20 0.05%. Non-specific binding was eliminated by the addition of 100 µl of saturation buffer containing gelatin (Merck) 0.5% in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) to each well, followed by incubation at 37°C for 1 h. Each ELISA microplate contained duplicate positive control wells consisting of 100 µl of allantoic fluids infected with influenza type A or B of known HA titre diluted in PBS-bovine serum albumin (BSA) 1% containing, Tween-20 0.1%, and duplicate wells containing 100 µl of uninfected allantoic fluids as negative controls. Unknown samples were added in duplicate at 100 µl/well and incubated at 37°C for 1 h. Anti-A or anti-B influenza mouse MAbs (WHO Influenza Reference Center, CDC, Atlanta, USA), diluted 1 in 1250 in PBS containing BSA 1% and Tween-20 0.1% were added (100 µl) to the wells. The plates were incubated for 30 min at 37°C and 100 µl of biotinylated anti-mouse antibodies (BIOSYS, France) diluted 1 in 4000 in PBS containing BSA 1% and Tween-20 0.1% were added to each well. After incubation at 37°C for 30 min, 100 µl of horseradish peroxidase-avidin D conjugate (Vector Laboratories, CA) diluted 1 in 5000 in PBS containing BSA 1% and Tween-20 0.1% were added to each well. The plates were incubated at 37°C for 10 min. Finally, 100 µl of substrate solution containing 10 mg *o*-phenylene diaminehydrochloride in 25 ml of 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5) and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added immediately before use to each well and the plates were incubated in the dark at room temperature for 30 min, at which time the reaction was stopped by the addition of 3 N HCl 100 µl/well. The absorbance was measured at 492 nm and 630 nm in a Dynatech ELISA microplate reader MR 5000 (Dynatech Laboratories, VA, USA). The positive cut-off was adjusted to 0.3 OD units, as all the negative controls gave an OD value < 0.3 units. All samples with OD values above the positive cut-off were considered positive and those with OD values under this cut-off were considered negative.

### *Viral RNA extraction and cDNA synthesis*

Viral RNA was extracted from 250-µl portions of either the primary samples or the infected allantoic or

amniotic fluids, or both, with TRIzol (Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA), according to the manufacturer's recommendations. Type A (H1N1) and (H3N2) and type B isolates previously identified by the WHO Influenza Reference Center in London served as positive controls; while uninfected allantoic fluids served as negative controls. For cDNA synthesis, 5  $\mu$ l of extracted viral RNA were incubated at 70°C for 5 min with 2.5  $\mu$ l of random hexanucleotide primers (40  $\mu$ g/ $\mu$ l) (New England Biolabs, MA, USA) and RNasin (Promega, WI, USA) 20 U/ $\mu$ l, quenched on ice and then 5  $\mu$ l of 5 $\times$  reaction buffer (Promega), M-MLV reverse transcriptase (Promega) 100 U/tube, 5  $\mu$ l of 10 mM solution of the four deoxynucleotide triphosphates (Promega) and sterile H<sub>2</sub>O (Sigma) were added to give a 25- $\mu$ l final volume. The reactions were incubated at 37°C for 1 h and at 95°C for 5 min in a Techne Progene thermal cycler. The reaction product was stored at -20°C.

#### Nested PCR

Influenza viruses were typed as A or B by nested PCR with primers that amplified a highly conserved region of the internal viral matrix protein gene [19]. Type A viruses were further subtyped with HA1, HA2 and HA3 as well as NA1 and NA2 specific primers that hybridise to conserved regions of the haemagglutinin and neuraminidase genes of influenza, respectively [19]. The sensitivity and specificity of the primer pairs in the nested PCR have been reported [19]. Nested PCR took place in two consecutive amplifications. The first amplification reaction contained 5  $\mu$ l of 10 $\times$  reaction buffer (Minotech, Crete, Greece), 4  $\mu$ l of a 10 mM solution of the four deoxynucleotide triphosphates (Promega), 2 units of Taq DNA Polymerase (Minotech), 2  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ l of cDNA, 200 pmoles of the outer primers and sterile H<sub>2</sub>O to 50  $\mu$ l total volume. The reactions were amplified in a Techne Progene Thermal Cycler for 25 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 50°C for 10 s and elongation at 72°C for 30 s. Two  $\mu$ l of the first PCR amplification were added to a second PCR reaction containing the inner pair of primers and amplified for 40 cycles under the same cycling conditions. Amplification products were analysed by agarose (Gibco

BRL, Ultra Pure agarose, electrophoresis grade) 2% gel electrophoresis in 1 $\times$  TBE buffer, stained with ethidium bromide 1  $\mu$ g/ml and visualised with a UV transilluminator (Foto/Phoresis, Fotodyne, WI, USA).

#### Statistical analysis

The SPSS statistical package was used to analyse the data generated in this study. Differences between the two screening methods were determined by the  $\chi^2$  test.

#### Results

Tables 1-5 summarise the study findings. More specifically, screening 150 primary samples which had been propagated in embryonated hens' eggs by the HI method, revealed that 25 (16.7%) were infected by influenza viruses, 19 (76%) with type A (H3N2) and 6 (24%) with type B strains. Screening the same primary samples by IC ELISA revealed 17 (11.3%) cases infected with influenza virus, 13 (76.4%) of which were type A and 4 (30.7%) type B. Eight additional samples were found to be influenza positive, six with type A and two with type B strains, by IC ELISA after three passages of the primary samples in embryonated hens' eggs. Of the 25 samples positive by IC ELISA, 24 (96%) were positive for influenza infection by the reference method. One primary sample that was positive by IC ELISA did not yield a positive result after three passages in eggs. Thus, IC ELISA underestimated influenza positive primary samples, relative to the reference method. It follows from the results that propagated samples contained a higher concentration of

**Table 1.** Influenza virus detection by virus isolation, IC ELISA and RT-PCR

Method	Number (%) of samples (n = 150)	
	Positive	Negative
Virus isolation	25 (16.7)	125 (83.3)
IC ELISA on primary samples	17 (11.3)	133 (88.7)
IC ELISA on propagated samples	25 (16.7)	125 (83.3)
RT-PCR on primary samples	29 (19.3)	121 (80.7)
RT-PCR on propagated samples	29 (19.3)	121 (80.7)

**Table 2.** Detection of influenza virus in primary samples by virus isolation, IC ELISA and RT-PCR

Method	Number of samples	Number (%) with equivalent result by		
		Virus isolation	IC ELISA	RT-PCR
Virus isolation	positive	25	16 (64)	25 (100)
	negative	125	125 (100)	121 (96.8)
IC ELISA	positive	17	16 (64)	17 (100)
	negative	133	125 (94)	121 (91)



**Table 3.** Year 1 influenza identifications by virus isolation, IC ELISA and RT-PCR

Method	Number (%) of samples (n = 70)	
	Positive	Negative
Virus isolation	11 (15.7)	59 (84.3)
IC ELISA on primary samples	7 (10)	63 (90)
IC ELISA on propagated samples	11 (15.7)	59 (84.3)
RT-PCR on primary samples	13 (18.6)	57 (81.4)
RT-PCR on propagated samples	13 (18.6)	57 (81.4)

**Table 4.** Year 2 influenza identifications by virus isolation, IC ELISA and RT-PCR

Method	Number (%) of samples (n = 80)	
	Positive	Negative
Virus isolation	14 (17.5)	66 (82.5)
IC ELISA on primary samples	10 (12.5)	70 (87.5)
IC ELISA on propagated samples	14 (17.5)	66 (82.5)
RT-PCR on primary samples	16 (20)	64 (80)
RT-PCR on propagated samples	16 (20)	64 (80)

virus particles that were detected by IC ELISA, increasing the number of overall positive results found by that method. Screening the same 150 clinical specimens before and after propagation in embryonated hens' eggs by RT-PCR revealed 29 (19.3%) infected by influenza viruses, 22 (75.8%) with type A subtype H3N2 and 7 (24%) with type B strains. All samples that were influenza positive by virus isolation were also positive by RT-PCR. There was 100% correlation in the type and subtype of influenza-positive samples determined by RT-PCR and virus isolation. RT-PCR detected four additional positive samples in the primary samples, three type A (H3N2) and one type B, compared with virus isolation. These PCR-positive samples were negative after three passages in eggs. One of the three A (H3N2) samples which was positive by PCR was found to be positive by IC ELISA on the primary samples. These findings are summarised in Tables 1 and 2. Tables 3 and 4 show the number of positive and negative influenza detections by the three methods for the first and second year of surveillance, respectively. Table 5 compares the sensitivities and specificities as well as the diagnostic values and false

positive and negative results in IC ELISA and RT-PCR with primary or propagated samples. There was a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) between IC ELISA (64%) and RT-PCR (100%) in the sensitivity of influenza detection in the primary samples.

## Discussion

Most of the methods frequently used to screen for influenza infection, such as ELISA and immunofluorescence (IF), require propagated clinical material for sensitive, specific and reliable viral detection. Recently developed RT-PCR methods offer increased sensitivity for direct influenza virus detection, typing and subtyping in primary clinical specimens [6, 10, 18]; thus obviating the need to propagate the virus in embryonated hens' eggs or tissue culture. RT-PCR has been shown to have increased sensitivity over ELISA and IF for influenza detection in clinical samples [6, 18]; this facilitates early administration of antiviral treatment and has a beneficial role in the overall management of influenza epidemics [17]. A weakness of RT-PCR is the ease with which minor contamination may yield false-positive results, a possibility that is even more pronounced with nested PCR methods.

In the present study, RT-PCR detected four more influenza-positive samples than virus isolation in eggs. This discrepancy of RT-PCR relative to the reference method may have derived from the potential presence of inactive viruses in the clinical sample, which are usually undetectable by virus isolation methods. This loss of virus viability is possibly due to prolonged storage of samples under non-ideal temperature conditions before arrival at the laboratory or the presence of partially inactivated virus in the clinical sample, or both [17, 19]. Compared with RT-PCR, IC ELISA had lower sensitivity for the detection of influenza infection directly from primary clinical samples [17, 18]. IC ELISA detected 17 influenza viruses in primary samples (as compared with 29 by RT-PCR), and 25 in propagated samples, 24 of which were identified as influenza virus-positive by the reference virus isolation method. This increase in IC ELISA sensitivity following viral propagation demonstrates the dependence of the method on the viral titre. IC ELISA detected one influenza-positive sample, which was also positive by

**Table 5.** Sensitivity, specificity, diagnostic value and false positive and negative values for IC ELISA and RT-PCR

Method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Diagnostic value (%)		False	
			positive	negative	positive (%)	negative (%)
IC ELISA on primary samples	64	98.4	94.1	92.5	5.9	7.5
IC ELISA on propagated samples	100	100	100	100	0	0
RT-PCR on primary samples	100	96.8	86.2	100	13.8	0
RT-PCR on propagated samples	100	96.8	86.2	100	13.8	0

Sensitivity: true positives/sum of influenza positive samples according to the reference method. Specificity: true negatives/sum of influenza negative samples according to the reference method. Positive diagnostic value: true positives/true positives + false positives. Negative diagnostic value: true negatives/true negatives + false negatives.

RT-PCR but was negative after propagation in eggs, suggesting the presence of inactive virus in the sample. It is concluded that, when used as a screening method for influenza detection, RT-PCR offers a significant advantage over IC ELISA because of its superior sensitivity and its ability to detect influenza infection even when viral inactivation has taken place. However, viral isolation in eggs or tissue culture and subsequent strain identification is pivotal in the yearly surveillance of influenza, as it enables antigenic analysis of the isolated virus and contributes to the yearly recommendation of the WHO for the influenza vaccine.

## References

1. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; **56**: 152-179.
2. Sprenger MJW, Mulder PGH, Beyer WEP, Van Strik R, Masurel N. Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease, 1967-1989. *Int J Epidemiol* 1993; **22**: 334-340.
3. Hannoun C. Role of international networks for the surveillance of influenza. *Eur J Epidemiol* 1994; **10**: 459-461.
4. Cate TR. Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am J Med* 1987; **82**: 15-19.
5. Spada B, Bielher K, Chegas P, Kaye J, Riepenhoff-Talty M. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children. *J Virol Methods* 1991; **33**: 305-310.
6. Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2076-2082.
7. Chomel JJ, Thouvenot D, Onno M, Kaiser C, Gourreau JM, Aymard M. Rapid diagnosis of influenza infection of NP antigen using an immunocapture ELISA test. *J Virol Methods* 1989; **25**: 81-91.
8. Duverlie G, Houbart L, Visse B *et al*. A nylon membrane enzyme immunoassay for rapid diagnosis of influenza A infection. *J Virol Methods* 1992; **40**: 77-84.
9. Claas ECJ, van Milaan AJ, Sprenger MJW *et al*. Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infections in respiratory samples from a children's hospital. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2218-2221.
10. Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1180-1184.
11. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2990-2995.
12. Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 623-628.
13. Schweiger B, Lange I, Heckler R, Willers H, Schreier E. Rapid detection of influenza A neuraminidase subtypes by cDNA amplification coupled to a simple DNA enzyme immunoassay. *Arch Virol* 1994; **139**: 439-444.
14. Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. Comparison of reverse transcription-PCR tissue culture and with other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 2604-2606.
15. Chomel JJ, Remilleux MF, Marchand P, Aymard M. Rapid diagnosis of influenza A. Comparison with ELISA immunocapture and culture. *J Virol Methods* 1992; **37**: 337-344.
16. Waner JL, Todd SJ, Shalaby H, Murphy P, Wall LV. Comparison of Directigen FLU-A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 479-482.
17. Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* 1998; **56**: 168-173.
18. Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 1999; **59**: 215-220.
19. Zhang W, Evans DH. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991; **33**: 165-189.

**Molecular and phylogenetic analysis of haemagglutinin  
and neuraminidase sequences from recent human  
influenza type A (H3N2) viral isolates  
in Southern Greece**

**E. T. Plakokefalos<sup>1,2,4</sup>, P. Markoulatos<sup>2</sup>, N. Spyrou<sup>1,2</sup>,  
T. A. Bei<sup>3,4</sup>, and N. C. Vamvakopoulos<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>National Influenza Center, Southern Greece, Hellenic Pasteur Institute,  
Athens, Greece

<sup>2</sup>Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,  
University of Thessalia, Larisa, Greece

<sup>4</sup>Department of Biology and Genetics, Faculty of Medicine,  
University of Thessalia, Larisa, Greece

Accepted April 21, 2001

**Summary.** Eighteen haemagglutinin (HA1) gene segments and eleven neuraminidase (NA) genes of human influenza type A (H3N2) viruses isolated from non-vaccinated individuals presenting severe influenza-like illness at peak influenza activity in Southern Greece during the surveillance period 1996–1999, were subjected to sequence and phylogenetic analyses following propagation in embryonated hen's eggs. The HA1 gene segment of the clinical isolates differed from the recent reference influenza type A (H3N2) vaccine strains in an Ile at residue 186, a Val at residue 194 and a Val at residue 226 for one, two and thirteen isolates of the 1996–1997 and 1996–1999 periods, respectively. The analogous differences in the NA gene were confined in an Asp to Asn substitution at residue 198 in one A/Wuhan/359/95 (H3N2)-like isolate of the 1996–1997 period, primarily. In addition, phylogenetic analysis revealed that an isolate of the 1997–1998 period was a recombinant with its HA1 gene segment being closely related to that of A/Wuhan/359/95-like viruses and its NA to viruses of the A/Sydney/5/97 (H3N2) lineage. These findings confirmed the profound genetic instability of influenza type A (H3N2) viruses and underscored the importance for periodic molecular surveys of HA and NA in the effective prevention and management of viral outbreaks. Most importantly, however, they contributed the first complete epidemiological material for influenza in Southern Greece, the archival nature of which constitutes valuable reference for future surveys.

### Introduction

Influenza virus types A, B and C and Thogotovirus belong to the *Orthomyxoviridae* family [2, 3]. They are enveloped particles containing two major surface glycoproteins, haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) and a multi-segmented single-stranded RNA genome of negative polarity [1]. Influenza types A and B are associated with epidemic disease in humans while type C has sub-clinical importance. Influenza type A, whose infection is not restricted to humans is further divided into 15 HA and 9 NA subtypes, which are present in aquatic birds [30]. Human subtypes H1N1 and H2N2 cause acute respiratory illness and have been associated with all influenza epidemics and pandemics of this century, until the late '60s primarily. From the emergence of the H3 subtype in 1968 however, the dominant worldwide circulation of H3N2 viruses has been associated with the vast majority of severe influenza outbreaks [12]. The accumulation of point mutations, may lead to gradual antigenic change of surface glycoproteins and the emergence of novel viral strains (antigenic drift). This is partly due to immune pressure from the host organism. Genetic recombination between co-infecting influenza viruses from different species of infected hosts, may create new viral subtypes conferring drastic antigenic change (antigenic shift) to the recombinant. Such recombinants may escape host immunity protection, generating novel virulence characteristic [13]. HA has a dual role in the early stages of viral replication as it binds to cellular oligosaccharide receptors containing sialic acid (SA) and mediates endocytosis [5]. NA catalyzes the removal of a SA moiety from viral envelope proteins, causing the release of newly assembled viral particles and the prevention of viral aggregation [9, 27].

The precursor HA0 molecule is cleaved by cellular proteases into the HA1 and HA2 segments, that is a necessary step in viral infection [5]. Variable antigenic regions on the HA1 domain are potential targets of neutralizing antibodies. Amino acid substitutions in these regions (A to E), have been associated with all epidemics in humans [6]. In contrast, the amino acids within the receptor binding site (RBS) of the HA1 domain are highly conserved [6, 8]. In the NA gene product, disease-implicated substitutions are located in the globular head and the catalytic site of the protein [9, 27]. Human influenza HA preferentially recognizes SA containing receptors linked to galactose by  $\alpha$ 2,6 linkages (SA $\alpha$ 2,6Gal), whereas its avian homologue preferentially recognizes SA $\alpha$ 2,3Gal [10, 23]. In human H3 influenza viruses, substitutions at residues 226 and 228 alter RBS specificity by modifying the preferential recognition of SA-Gal linkage, the erythrocyte agglutinating ability and host species selection [22, 23, 29]. Amino acid substitutions at residues 145, 156, 186, 193 and 226 of human H3 viruses have been shown to occur as a result of viral adaptation to growth in eggs [14, 19-21, 26, 29].

The elderly and individuals with chronic respiratory and cardiovascular disease exhibit elevated indices of morbidity and mortality as a result of complications from influenza infection each year. Prevention, treatment and overall control of influenza activity, requires continuous surveillance of both HA and NA products, in order to properly modify and optimize the effectiveness of the current



trivalent influenza vaccine and anti-viral treatments [3, 4]. Periodic sequencing of HA1 and NA gene products provides a sensitive method to monitor the overall genetic variation of currently circulating viral strains and provisionally classify the origin of new mutations [14, 20]. Phylogenetic analyses of sequence data on the HA and NA genes can provide further information on the evolutionary relationships and lineage of circulating strains [7, 12, 25, 28, 32].

In the present study we performed sequence and phylogenetic analyses of 18 HA (HA1) and 11 NA genes from 18 recently circulating human influenza type A (H3N2) viruses, isolated in Southern Greece during peak influenza activity from non vaccinated individuals, following propagation of the primary samples in embryonated hen's eggs. The clinical isolates were classified into three distinct groups according to their HA1 domain and in two according to their NA. A recombinant isolate of the 1997–1998 period possessing a A/Wuhan/359/95-like HA1 and a A/Sydney/5/97-like NA was also identified, further suggesting that genetic recombination may also occur between co-infecting viral species.

## Materials and methods

### *Clinical samples*

The specimens were submitted for laboratory characterization to our National Influenza Reference Center from a number of collaborating clinicians evenly distributed in various locations of Southern Greece. A total of 350 clinical respiratory samples (nasal and pharyngeal swabs) were collected from non-vaccinated individuals aged between 2 and 65 years old, presenting influenza-like symptoms for up to three days from their onset, during the three year (1996–1999) surveillance period. All samples were maintained in standard virus transport medium and stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  for up to three days from the time of collection to final processing, as previously described [33].

### *Virus isolation and typing*

Influenza viruses were isolated by propagation in 8-day old embryonated hen's eggs. Following the determination of viral titer in H.A units, the isolates were characterized by the haemagglutination inhibition method (HAI) [31]. Independent confirmation of the HAI results in seven from the eighteen influenza isolates analyzed in this study, was made by WHO World Influenza Reference Center at the National Institute for Medical Research (London, UK), and the combined findings are shown in Table 2.

### *Selection of viral isolates for sequence analysis*

Eighteen influenza type A (H3N2) viruses isolated from clinical samples collected from regions of peak influenza epidemic activity in Southern Greece during the above mentioned surveillance period, were selected for molecular analysis of the HA1 gene segment. The NA gene was also analyzed in eleven of these isolates (Table 1). The gravity of symptoms presented by the infected subjects which included severe influenza-like illness, (elevated body temperature ( $> 38.5^{\circ}\text{C}$ ), myalgia, headache, rhinitis, laryngitis, and general fatigue), as well as complications from influenza infection such as bronchitis and pneumonia, were used as criteria for selecting the influenza viral isolates for sequencing analysis. The variable responsiveness of collaborating clinicians during 1997–1998 surveillance period, was the primary reason for the uneven annual distribution of influenza isolates submitted and studied.



Table 1. List of influenza type A (H3N2) viruses examined

Virus	Abbreviation	Date of collection	GenBank Accession No.	
			HA1	NA
A/Aichi/2/68	Aichi268		V01085	
A/Hong Kong/8/68	HK868			U42630
A/Udomv/307/72	Udomv30772		M54895	J02168
A/Victoria/3/75	VC375		V01086	J02172
A/Johannesbourg/33/94	JHB3394		AF008774	U43425
A/Wuhan/359/95	WUH35995		AF008722	U51246
A/Nanchang/933/95	NC93395		AF008725	
A/Sydney/5/97	SYD597		AF087706	
A/Shangdong/9/93	SH993			U43419
A/New York/16/94	NY1694			U43424
A/Beijing/353/89	BE35389		U97740	U42635
A/Shanghai/11/87	SH1187		AF008886	
A/Beijing/32/92	BE3292		AF008812	U42770
A/Alaska/10/95	AK1095		AF008748	U51245
A/Stockholm/18/98	ST1898		ISDNSW0002	
A/Victoria/30/97	VC3097		AF180633	
A/Wellington/3/97	WE397		AF180579	
A/Panama/2007/99	PA200799		ISDNCDA001	
A/Umea/3/00	Umea300		ISDNSWA015	
A/Malmoe/3/99	Malmoe399		ISDNSWA10	
A/Beijing/244/96	BE24496		AF180586	
A/Shanghai/24/90	SG2490			U42636
A/Guangdong/25/93	GD2593			U42778
A/India/263/93	India26393			U42780
A/Singapore/7/94	SN794			U43422
A/Miyagi/29/95	MY2995			U71143
A/Fukushima/140/96	FU14096			AF038263
<b>Clinical isolates</b>				
<b>1996–1997</b>				
A/Greece/1/97	G197	30/1/97	AF315567	AF316811
A/Athens/2/97	A297	20/1/97	AF315568	AF316812
A/Greece/4/97	G497	15/2/97	AF315569	
A/Athens/23/97	A2397	15/2/97	AF315570	
<b>1997–1998</b>				
A/Athens/1/98	A198	30/1/98	AF315571	AF316814
A/Athens/2/98	A298	30/1/98	AF316817	
A/Athens/7/98	G798	10/2/98	AF316818	
A/Greece/10/98	G1098	10/2/98	AF316819	
A/Athens/16/98	A1698	24/2/98	AF316820	AF316815
A/Greece/18/98	G1898	24/2/98	AF316821	AF316816
A/Greece/19/98	G1998	24/2/98	AF315559	
A/Athens/76/98	A7698	10/3/98	AF315560	AF316805
A/Athens/94/98	A9498	10/3/98	AF315561	AF316806

(continued)

Table 1 (continued)

Virus	Abbreviation	Date of collection	GenBank Accession No.	
A/Greece/103/98	G10398	18/3/98	AF315562	
A/Greece/106/98	G10698	20/3/98	AF315563	AF316807
<b>1998-1999</b>				
A/Greece/109/99	G10999	25/2/99	AF315564	AF316808
A/Greece/132/99	G13299	19/4/99	AF315565	AF316809
A/Athens/135/99	A13599	19/4/99	AF315566	AF316810

Table 2. Antigenic analysis of clinical isolates by haemagglutination inhibition with post infection ferret sera

	A/JHB 33/94	A/Wuh 359/95	A/NC 933/95	A/SA 1147/96	A/Brat 6/97	A/Syd 5/97
A/JHB/33/94	1280	80	80	40	80	< <sup>a</sup>
A/Wuhan/359/95	160	2560	1280	320	160	<
A/Nanchang/933/95	160	1280	2560	320	320	160
A/South Africa/1147/96	80	60	320	1280	320	320
A/Bratislava/6/97	80	320	320	320	640	160
A/Sydney/5/97	<	80	80	320	320	2560
<b>Group 1<sup>b</sup></b>						
A/Greece/1/97	<	640	320	160	160	80
A/Athens/94/98	<	640	320	160	320	80
<b>Group 2</b>						
A/Athens/2/97	0	160	640	1280	320	160
A/Greece/4/97	0	160	640	1280	320	160
A/Athens/23/97	160	320	640	1280	640	320
A/Athens/1/98	80	160	320	640	320	160
A/Athens/2/98	80	160	320	640	320	160
<b>Group 3</b>						
A/Athens/7/98	<	160	160	320	160	1280
A/Greece/10/98	<	160	320	640	320	2560
A/Athens/16/98	<	320	320	320	160	2560
A/Greece/18/98	<	320	320	320	160	2560
A/Greece/19/98	<	80	80	160	80	640
A/Athens/76/98	<	160	320	640	320	2560
A/Greece/103/98	<	160	160	320	160	640
A/Greece/106/98	<	160	160	320	160	640
A/Greece/109/99	<	160	160	320	160	640
A/Greece/132/99	<	80	160	160	160	1280
A/Athens/135/99	<	80	160	160	160	1280

<sup>a</sup> < less than 40<sup>b</sup> Groups 1, 2 and 3 represent A/Wuhan/359/95, A/South Africa/1147/96 and A/Sydney/05/97 like viruses, respectively

### *RNA extraction and cDNA synthesis*

Total RNA was extracted from 200  $\mu$ l aliquots of allantoic fluid with 350  $\mu$ l TRIzol (Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA), according to manufacturer's recommendations, in the presence of 20  $\mu$ g glycogen, molecular biology grade (Boehringer, Germany). Five  $\mu$ l viral RNA, was reverse transcribed with 20 U/ $\mu$ l AMV reverse transcriptase (RT), (Promega, WI, USA), utilizing 0.2  $\mu$ M oligo UN1 primer (3'AGCAAAGCAGG 5') complementary to the 3' terminal segment of viral RNA, in the presence of 2.4  $\mu$ l 5  $\times$  RT buffer (Promega, WI, USA), 100 mM DTT, 2  $\mu$ l 5 mM dNTP's (Promega, WI, USA), 20 U/ $\mu$ l RNasin (Promega, WI, USA) and H<sub>2</sub>O (Sigma, USA) to 12  $\mu$ l. cDNA synthesis took place at 42 °C for 45 min, 55 °C for 15 min and 95 °C for 5 min. cDNA was either stored at -80 °C or used immediately in polymerase chain reaction (PCR).

### *PCR of HA1 and NA*

The HA1 domain of the H3 gene, was amplified with 0.5  $\mu$ M H3/6B/+ (5' AGCAGGGGATA-ATTCTATTAACC 3') and 0.5  $\mu$ M H3/1197/- (5' CTGCTTGAGTGCTTTAAGATCTG 3') primers (Genset, France), in a reaction containing 2  $\mu$ l cDNA, 2.5 U Taq polymerase, 5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR buffer, 2.9  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, USA), 2  $\mu$ l 5 mM dNTP's (Pharmacia Biotech, Sweden) and H<sub>2</sub>O (Sigma, St. Louis, USA) to 50  $\mu$ l. Following denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles of amplification were performed as follows: 94 °C for 45 sec, 45 °C for 45 sec and 72 °C for 90 sec, followed by a 72 °C incubation for 5 min in a Robocycler Gradient 96 (Stratagene, USA). The NA segment of the viral genome was amplified with N2/6/+ (5' AGCGGAGTGAAGATGAATCCAA 3') and N2 1440/- (5' ATTGCGAAAGCTTATATAG-GCATG 3') primers, 0.5  $\mu$ M each, (Genset, France), in a reaction analogous to that for HA1 above. Following a denaturation step at 94 °C for 2 min, 30 cycles of amplification were performed as follows: 94 °C for 45 sec, 60 °C for 45 sec and 72 °C for 2 min, followed by a 72 °C incubation for 5 min, in a Robocycler Gradient 96 (Stratagene, USA).

### *Sequencing*

The PCR products were purified in QIAquick spin columns (QIAGEN, USA), according to manufacturer's instructions. Purified DNA was then quantified in 1% agarose gel (Gibco, BRL), using SmartLadder molecular weight markers (EUROGENTEC, Belgium). The HA1 PCR products that were generated with primers H3 6B/+ and H3/1197/- (1191bp long), were sequenced by means of oligonucleotides H3 6B+ , H3 361/+ (5' GCAACTGTTACCCT-TATGATGTG 3'), H3 941/- (5' GCTTCCATTTGGAGTGATGC 3') and H3/1197/-. The NA PCR products that were generated with primers N2 6+ and N2 1440- (1434bp long), were sequenced by means of oligonucleotides N2 6+ , N2 369/+ (5' CGAGAGAACCCTTAT-GTGTCATGC 3'), N2 823+ (5' GTCAGGAAGTGCTCAGCATGTAG 3'), N2 972/- (5' GCACACATAACTGGAATCAATGC 3') and N2 1440-. 0.5  $\mu$ M each, (Genset, France). Sequencing reactions contained 25-50 ng purified DNA, 4  $\mu$ l 'BigDye Terminator', 0.5  $\mu$ M primers and H<sub>2</sub>O to a final volume of 10  $\mu$ l. Following template denaturation at 95 °C for 2 min, 25 cycles consisting of 96 °C for 45 sec, 50 °C for 30 sec and 60 °C for 4 min per cycle, were carried out in a Robocycler Gradient 96 (Stratagene, USA). Products were then precipitated with 2 volumes of ethanol, resuspended in 5  $\mu$ l buffer (blue dextran 8 mg/ml, EDTA 4 mM, pH 8.0; deionized formamide 83%) and denatured for 2 min at 100 °C. Aliquots of 1.5  $\mu$ l each were analyzed in a 5% (19:1) acrylamide bisacrylamide gel. Sequencing was performed by the Sanger method on an automated 'ABI Prism 377' (Perkin Elmer Cetus, USA) sequencer. The nucleotide and amino acid sequences of our influenza clinical isolates were compared to those of recent influenza type A (H3N2) vaccine strains, retrieved

from GenBank (Table 1). The analysis of sequence alignments was made by the programs 'Sequencing Analysis 2.1' and 'Analysis and Complign', MacMolly™. GenBank entries AF 315559, AF 315562, AF 315569, AF 315813, AF 315814, AF 316818 and AF 316820 contain premature stop codons leading to minor truncations at the carboxy terminus of the respective peptide products.

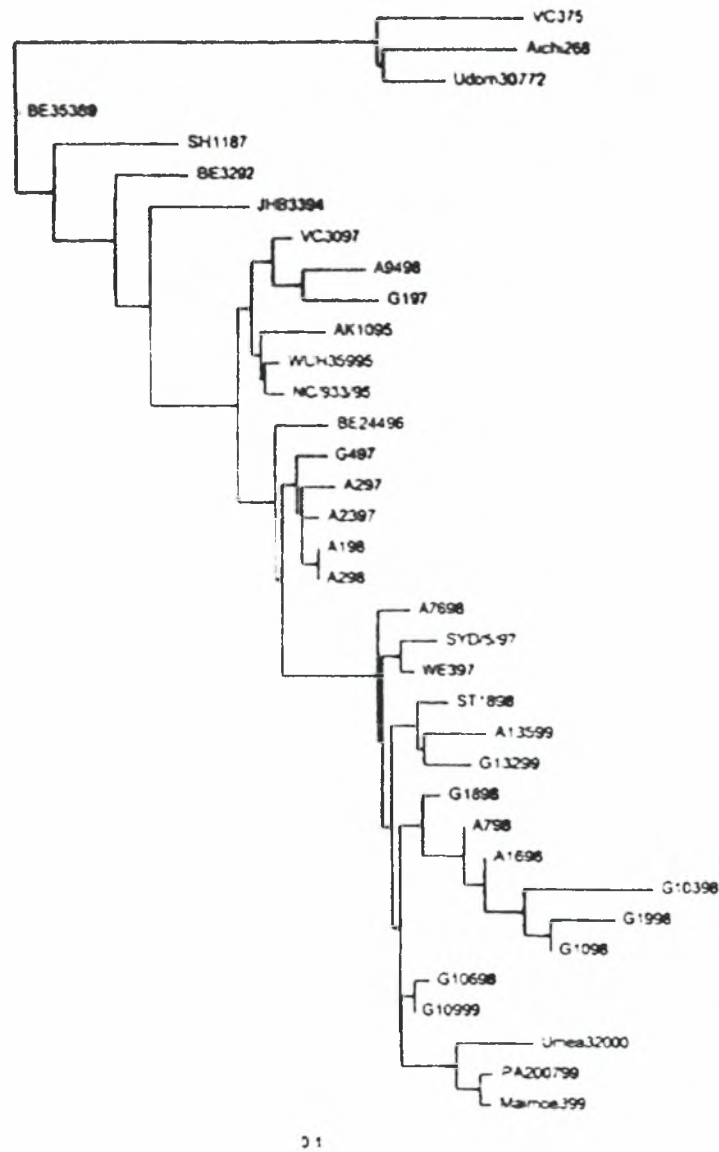


Fig. 1. Construction of HAI nucleotide sequence phylogenetic tree of influenza type A (H3N2) clinical isolates and reference viruses based on the NJ method

*Phylogenetic analysis*

The construction of nucleotide and amino acid based phylogenetic trees, was performed by the CLUSTAL X program, using the neighbor-joining (NJ) method [15, 24]. In each case, our influenza isolates were compared with several influenza type A (H3N2) reference strains and clinical isolates of the same period from other countries, which were obtained from the GenBank, establishing the degree of genetic proximity (Figs. 1 and 2). Genetically distant influenza type A (H3N2) reference strains, were used as out-groups for the construction of phylogenetic trees.

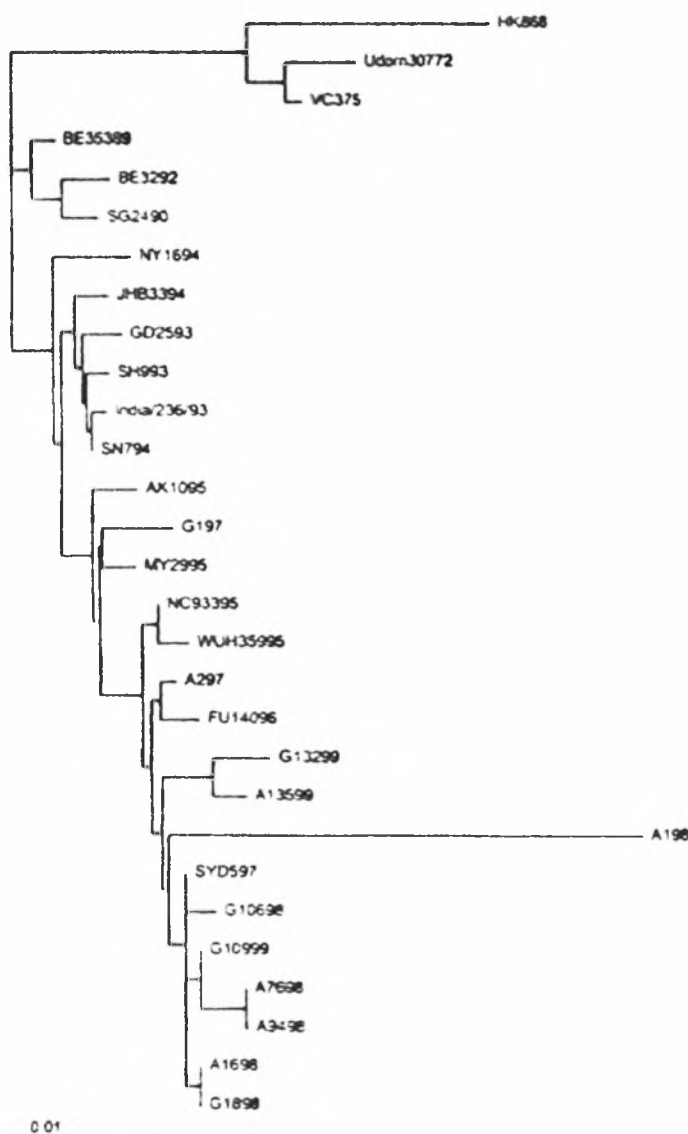


Fig. 2. Construction of NA nucleotide sequence phylogenetic tree of influenza type A (H3N2) clinical isolates and reference viruses based on the NJ method

## Results

### *Antigenic analyses*

Analysis of the 350 samples examined, revealed that 31 (8.9%) carried viable influenza strains. Further characterization revealed that 26 (84%) of those were type A (H3N2) and only 5 (16%) type B, as detailed elsewhere [33]. The 18 influenza isolates that were selected for molecular characterization, fall by HAI analysis into three groups (Table 2). Group 1 included two A/Wuhan/359/95 (H3N2)-like isolates, one from the 1996–1997 period (G197) and one from the 1997–1998 period (A9498), that was also assigned as recombinant by molecular analysis. Group 2 consisted of five A/South Africa/1147/96 (H3N2)-like viruses from the 1996–1997 and 1997–1998 periods. Group 3 contained eleven A/Sydney/5/97 (H3N2)-like viruses. Eight (G798, G1098, A1698, G1898, G1998, A7698, G10398, Gre10698) were from the 1997–1998 and three (G10999, G13299 and A13599) from the 1998–1999 period, respectively. The reduced HAI titers obtained for the group 1 isolates and for 4 isolates in group 3, against their homologous antisera, most likely reflect amino acid variation in their HA1 gene segments.

### *Amino acid sequence analysis*

The genetic variability of the 18 HA1 gene segments and the 11 NA genes, was analyzed by sequencing following three passages of the original clinical samples in embryonated hen's eggs. DNA sequence data of HA1 and NA were converted into amino acids and compared with the analogous domains of reference vaccine strains A/Sydney/5/97, A/Wuhan/359/95, A/Nanchang/933/95 (H3N2) and A/Johannesburg/33/94 (H3N2). Based on variations of the HA1 domain, our clinical isolates appeared to fall into three groups (Table 3). Group 1 and 2 possessed A/Wuhan/359/95 and A/South Africa/1147/96-like substitutions including Lys at

**Table 3.** Amino acid sequence variation in the HA1 gene segment of recent influenza type A (H3N2) isolates from Southern Greece

<b>Group 1<sup>a</sup>:</b>	A/Wuhan 359/95-like substitutions Residues: Lys 62, Thr 121, Gly 124, Asp 133, Val 144, Glu 158 and Asn 276 Isolates: G197 and A9498
<b>Group 2</b>	A/South Africa 1147/96-like substitutions Residues: Arg 142, Val 144, Lys 156 and Val 196 Isolates: A297, G497, A2397, A198 and A298
<b>Group 3:</b>	A/Sydney 5/97-like substitutions Residues: Glu 62, Ile 144, Gln 156, Lys 158, Ala 196 and Lys 276 Isolates: A798, G1098, A1698, G1898, G1998, A7698, G10398, G10698, G10999, G13299, A13599

<sup>a</sup>The classification of our isolates in three groups was based on the presence of representative amino acid substitutions in the HA1 domain relative to the three reference influenza type A (H3N2) viruses



		10	20	30	40	50	60
SYD597		QKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICDSPHRILD					
JHB3394	L					P	
WUH35995	L						
NC93395	L						
G197	L						
A9498						G	Q
A1698	L						
G798	L						
G1098	L						
G1998	L						
G10698	L	M					
G10999	L						
G1898	L						
G10398	L						
A7698	L						
G13299	L				S		
A13599	L				S		
A198	L						
A298	L						
A2397	L						
A297	L						
G497	L						

		70	80	90	100	110	120
SYD597		GENCTLIDALLGDPHCDGFGQNKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF					
WUH35995	K						
NC93395	K						
JHB3394	K						
G197	K				T		
A9498	K				T		
A1698							
G798							
G1098							
G1998							
G10698							
G10999							
G1898							
G10398				K			
A7698				K			
G13299							
A13599							
A198	K		D				
A298	K		D				
A2397	K		D				
A297	K		D				
G497	K		D				

Fig. 3 (continued)

Phylogenetic analysis of HA and NA genes

1909

	130	140	150	160	170	180
SYD597	NNESFNWTGVAQNGTSYACKRSSLKSFPSRLNWLHQLKYKYPALNVTMPNNDKFDKLYIW					
WUH35995	T G	D	G V		K E	
NC93395	T G	D	G V		K E	
JHB3394	I N	D K	G V		K E	G
G197	TK G	D	G VN		K E	
A9498	TK G	D	G V		K E	
A1698		S	R			
G798		S	R			
G1098		S	R			
G1998		S	R			
G10698		S	R			
G10999		S	R			
G1898		S	R			
G10398			R			
A7698			R			
G13299		F	R			
A13599		F	R			
A198			R V		K E	
A298			R V		K E	
A2397			R V		K E	
A297			R V		K E	
G497			R V		K E	

	190	200	210	220	230	240
SYD597	GVHHPSTSDQTSIYAQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVRGISSRISYWTIVKPG					
WUH35995		V				
NC93395	V	L V				
JHB3394		L VR		D Y	Q	
G197		V			V	
A9498		L V			V	
A1698		L T				
G798		L T				
G1098		L T				
G1998		L T				
G10698		L T			V	
G10999		L T			V	
G1898		T			V =	
G10398		L			V	
A7698		L			V	
G13299		L			V	
A13599		L			V	
A198		V V			V	
A298		V V			V	
A2397	I	L V			V	
A297		L V			V	
G497		L V				

Fig. 3 (continued)



	250	260	270	280	290	300
SYD597	DILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAFIGKCNSECITPNGSIFNDKPFQNVNRI					
WUH35995				N		
NC93395				N		
JHB3394		N		N	S	
G197				DN		
A9498				DN		
A1698	S					
G798	S					
G1098	S					
G1998	S					
G10698						
G10999						
G1898						
G10398				D		
A7698				D		
G13298			K			
A13599						G
A198					N	
A298					N	
A2397					N	
A297		L			N	
G497				S	N	

	310	320
SYD597	TYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQ	
WUH35995		
NC93395		
JHB3394		
G197		
A9498		
A1698		
G798		
G1098		
G1998		P
G10698		
G10999		
G1898		
G10398		E IK
A7698		
G13298	V	
A13598		
A198		
A298		
A2397		
A297		
G497		

Fig. 3. HA1 amino acid sequence alignment

residue 62, Val at residue 144, Gly at residue 124, Asp at residue 133 and Arg at residue 142. Group 3 possessed substitutions in the same 11 isolates characteristic of A/Sydney/5/97-like viruses, including Gln at residue 156, Lys at residue 158, Ala at position 196 and Lys at residue 276. Substitutions at both residues 122 and 198 (Asn<sup>122</sup> to Lys and Ala<sup>198</sup> to Thr) were found in 2 A/Wuhan/359/95-like (G/1/97 and A/94/98) and 8 A/Sydney/5/97-like isolates, respectively. These residues were located within the antigenic sites A and B of the HA1 domain. At residue 186, we observed a Ser to Ile substitution typical to egg-adapted variation for isolate A2397. Residue 194, which is located within the antigenic site B and is implicated in the attachment of HA to its receptor, had an Ile to Val substitution for isolates A198 and A298. Residue 226, which is implicated in receptor specificity and host range restriction, had an Ile to Val substitution in the majority (13 out of 18) of our clinical isolates. The substitutions in residues 186 and 226 were absent from all reference viruses, suggesting their potential relevance to egg-mediated adaptation and the restoration of haemagglutinating ability [25]. Alignments of the amino acid sequences of the HA1 gene segments of all 18 clinical isolates, were made relative to the A/Sydney/5/97 reference strain (Fig. 3).

Sequence analysis of NA, showed fewer changes from HA1. Variations of the NA gene fall in two groups (Table 4). Group 1 had A/Wuhan/359/95-like substitutions. More specifically, isolate G197 of the period 1996–1997, exhibited Asn at residue 43, Leu at residue 370, and Gly at residue 381. The Tyr<sup>336</sup> and Asp<sup>339</sup> substitutions, observed for the above isolate, may influence viral antigenicity [27]. An Asn<sup>198</sup> substitution was also found in isolate G197. Residue 198 located near the catalytic site of NA may influence its enzymatic activity [9, 27]. The ten group 2 isolates had A/Sydney/5/97-like substitutions, including Ser<sup>43</sup>, Asp<sup>127</sup>, Asp<sup>198</sup>, Lys<sup>221</sup>, His<sup>336</sup>, Phe<sup>370</sup>, and Glu<sup>381</sup>. In four A/Sydney/5/97-like isolates (A297, A198, G13299, and A13599), A/Wuhan/359/95-like substitutions were also present at residues 43 and 370. The Ser<sup>370</sup> change observed for

**Table 4.** Amino acid sequence variation in the NA gene of recent influenza type A (H3N2) isolates from Southern Greece

<b>Group 1<sup>a</sup>:</b>	A/Wuhan/359/95-like substitutions Residues: Asn 43, Leu 370, and Gly 381 Isolate G197
<b>Group 2<sup>b</sup>:</b>	A/Sydney/5/97-like substitutions Residues: Ser 43, Asp 127, Asp 198, Lys 221, His 336, Phe 370, and Isolates: A297, A198, A1698, G1898, A7698, A9498, G10699, G10999, G13299 and A13599

<sup>a</sup>The classification of our isolates in two groups was based on the presence of representative amino acid substitutions in NA relative to the two reference influenza type A (H3N2) viruses

<sup>b</sup>Isolates A297 and A198 exhibited Asn<sup>43</sup> and Leu<sup>370</sup> substitutions. Isolates G13299 and A13599 exhibited Asn<sup>43</sup> substitution

	20	30	40	50	60	
SYD597	IGSVSLTIAIICFILMQIAILLVTTVTLHFKQYECSSPPNMQVMLCEPTIIERNITEIVY					
NC93395				N		
WUH35995				N		
JHB3394				N		
G197	T	I	C	N		
A297				N		
A1698						
G1898						
A7698						
A9498						
G10999						
G10698						
G13299				N		
A13599				N		
A198				N		
	70	80	90	100	110	120
SYD597	LITNTTIEKEICPKLAERYRNSKPOCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPIVSCDPD					
NC93395						
WUH35995				M		H
JHB3394		E				G
G197						G
A297						
A1698						
G1898						
A7698		K				
A9498		K				
G10999		K				
G10698						A
G13299						
A13599						
A198						
	130	140	150	160	170	180
SYD597	KCYQFALGQGTTLNRRHSNDTVHDRTFYRTLMLNELGVPPFHLGTKQVCLAWSSSSCHDGK					
NC93395					L	P
WUH35995					L	P
JHB3394						
G197						
A297						
A1698						
G1898						
A7698						
A9498						
G10999						
G10698					Y	
G13299						
A13599						
A198						

Fig. 4 (continued)

Phylogenetic analysis of HA and NA genes

1913

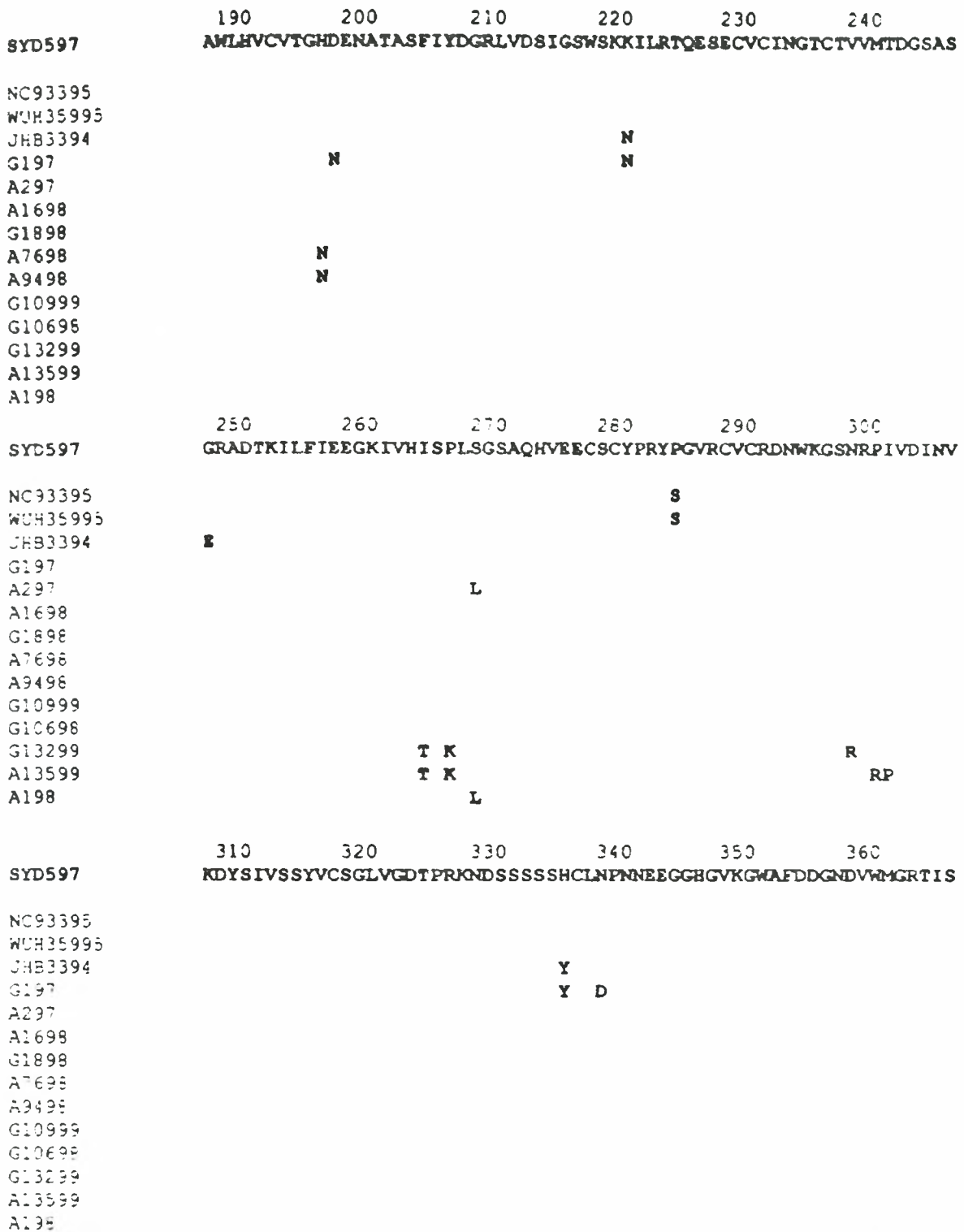


Fig. 4 (continued)

	370	380	390	400	410	420
<b>SYD597</b>	<b>EKFRSGYETFKVIEGWSKPNSKLGINRQVIVDRGNRSGYSGIFSVVEGKSCINRCFYVELI</b>					
NC93395	L	G				
WUH35995	L	G				
JHB3394	EL	G			S	
G197	L	G				
A297	L					
A1698				G		
G1898				G		
A7698	E	R				
A9498	E	R				
G10999						
G10698						
G13299	NS			E	M	
A13599	S			E	M	
A198	L					FD

	430	440	450
<b>SYD597</b>	<b>RGRKQETE VVWNTS NSI VVFCGTS GTYG</b>		
NC93395			
WUH35995			
JHB3394			
G197			
A297			
A1698			
G1898			
A7698			
A9498			
G10999			
G10698			
G13299			
A13599			
A198	<b>K KETGNSLVDLQYCC LWHLYIWN</b>		

Fig. 4. NA amino acid sequence alignment

two 1998-1999 isolates, may influence viral antigenicity. Sequencing and phylogenetic analysis revealed one isolate of the 1997-1998 period, (A9498), that was characterized as A/Wuhan/359/95-like by HAI, as well as by the sequence of its HA1 domain. Sequence analysis of its NA gene however, revealed similarity to NA's typical of A/Sydney/5/97-like viruses. Considering that this virus was isolated during worldwide dominance of A/Sydney/5/97, it most probably represented a recombination between two antigenically distinct viruses, as previously shown [7, 25, 28]. Alignments of the amino acid sequences of the NA gene of all 11 clinical isolates were made relative to the A/Sydney/5/97 reference strain (Fig. 4).

### *Phylogenetic analysis*

We compared the nucleotide sequences of 18 HA1 and 11 NA gene products from our influenza viral isolates. The isolates of the period 1996-1999 were divided into three groups, according to sequence variations on their HA1 gene segments. Group 1 was proximal to A/Wuhan/359/95 and contained isolates G197 and A9498. Group 2 was intermediate between A/Wuhan/359/95 and A/Sydney/5/97 and contained isolates A297, G497, A2397, A198 and A298. Group 3, which was proximal to A/Sydney/5/97, included isolates G798, G1098, A1698, G1898, G1998, A7698 and G10398. Isolates G10698, G10999 and G13299, A13599, which appear to have diverged from the A/Sydney/5/97-like group, form subgroups within it. The majority of isolates fall into the second and third groups (Fig. 1). Phylogenetic analysis of NA revealed two groups. Group 1 was close to A/Wuhan/359/95 and A/Nanchang/933/95 and group 2 was related to A/Sydney/5/97. They included two (G197, A297) and nine isolates (A198, A1698, G1898, A7698, A9498, G10698, G10999, G13299 and A13599), respectively. Overall, the NA gene product was less divergent compared to HA1 (Fig. 2), a finding that was consistent to an earlier report [7].

### **Discussion**

Continuous evolution of HA and NA surface antigens by antigenic drift and shift, is implicated in influenza epidemics and pandemics in humans. Effective prevention and management of influenza, requires annual surveillance of the molecular changes in the primary antigenic domains of these molecules from currently circulating clinical isolates. Sequence analysis of the HA1 domain, provided a very sensitive approach to the assessment of genetic variability and epidemic potential of viral isolates, revealing the presence of key substitutions at major antigenic sites. Phylogenetic analysis enabled the study of evolutionary relationships between clinical isolates and reference strains [12, 14]. Amino acid substitutions that can alter antigenicity, receptor binding specificity and haemagglutinating ability of human H3 isolates, may occur by multiple passages of the original samples in hen's eggs [19, 21, 26, 29]. Previous studies revealed that this host-mediated variation was influenced by a Leu to Glu change at residue 226, which was located within the RBS pocket [22], as well as by a Ser to Ile substitution at residue 186 [14, 20]. It has been shown that substitution at residue 226 alters H3 receptor specificity of human viral isolates towards erythrocytes from different species and restores their haemagglutinating ability towards avian erythrocytes [25]. The majority (13 out of 18) of our clinical isolates exhibited an Ile to Val substitution at this residue, which could be attributed to multiple passages in eggs or other hosts [26]. This is a purely correlational assignment however, the accuracy of which cannot be confirmed in our study.

Sequence and phylogenetic analyses of HA1 and NA from recent clinical influenza type A (H3N2) isolates in Southern Greece, revealed substitutions in the following residues of the HA1 domain: 1) residues 62, 121, 144, 124, 133 and 142 (groups 1 and 2), residues 156, 158, 196 and 276 (group 3). 2) residues 186



and 226, which are typical to egg-mediated adaptation and may influence viral antigenicity and erythrocyte agglutinating ability [21], and 3) residue 194, which is implicated in receptor binding [23, 29]. Substitution at residues 124 and 133 introduced N-glycosylation in our isolates, potentially altering their antigenicity [6, 8, 34]. Compared to the HA1 gene segment, the genetic variability of the NA gene was much lower, both in terms of number of residues substituted and overall fraction of genetically altered clinical isolates, indicative to its slower adaptability to immune pressure [7]. We observed substitutions at NA residues 43, 370 and 381 (group 1), 43, 127, 198, 221, 336, 370, and 381 (group 2) and at residue 198 that may potentially alter the antigenicity of NA (group 1). Furthermore, our molecular analysis revealed a recombinant virus (1 out of 18) as a testament of viral recombination in co-infected cells. This finding is in accordance to previous reports demonstrating the occurrence of similar genetic recombination between co-circulating influenza A (H3N2) viruses. The importance of these processes in viral evolution and the emergence of novel influenza A (H3N2) viruses has been documented extensively in the literature [7, 25, 32].

The clinical importance of the HA antigen in the management of influenza is well established [3, 25]. Clinical studies with recently developed neuraminidase inhibitors indicate that antiviral treatments may also afford effective control of influenza epidemics [4]. The present report emphasized the dominant roles of HA and NA in the biology of influenza viruses and provided potentially valuable epidemiological references for influenza in Greece.

#### Acknowledgements

We would like to thank Prof. S. van der Werf, Dr. J. C. Manuguerra, C. Rousseaux and R. Medeiros (Institut Pasteur, Paris, France), for hospitality and valuable assistance in sequence analysis, Dr. A. Hay (NIMR, UK) for providing us with reference antisera and the Research Committee of the University of Thessalia for financial support to Prof. N. C. V. (code 2094).

#### References

1. Lamb RA, Krug RM (1996) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Virology*. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp 1353–1395
2. Murphy FA (1996) Virus taxonomy. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Virology*. Lipincott-Raven, Philadelphia, pp 15–57
3. Cox NJ, Subbarao K (1999) Influenza. *Lancet* 354: 1277–1282
4. Hayden FG, Osterhaus A, Treavor JJ, Fleming DM, Aoki FY, Nicholson KG, Bohnen AM, Hirst HM, Keene O, Wightman K (1997) Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor Zanamivir in the treatment of Influenzavirus infections. *N Engl J Med* 337: 874–880
5. Steinhauer DA (1999) Role of the hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1–20
6. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426–431

7. Xu X, Cox NJ, Bender CA, Regnery HL, Swaw MW (1996) Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 224: 175-183
8. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ (1981) Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289: 373-378
9. Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303: 35-40
10. Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA (1997) Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233: 224-234
11. Lentz MR, Webster RG, Air GM (1987) Site-directed mutation of the active site of influenza neuraminidase and implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 26: 5351-5358
12. Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP (1983) Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* 48: 52-60
13. Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG (1996) Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217: 508-516
14. Ellis JS, Chakraverty P, Clewley JP (1995) Genetic and antigenic variation in the haemagglutinin of recently circulating human A (H3N2) viruses in the United Kingdom. *Arch Virol* 140: 1889-1904
15. Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
16. Katz JM, Wang M, Webster RG (1990) Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 64: 1808-1811
17. Katz JM, Webster RG (1992) Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells. *J Gen Virol* 73: 1159-1165
18. Katz JM, Webster RG (1988) Antigenic and structural characterization of multiple subpopulations of H3N2 influenza virus from an individual. *Virology* 165: 446-456
19. Katz JM, Naeve CW, Webster RG (1987) Host-cell mediated variation in H3N2 viruses. *Virology* 156: 386-395
20. Meyer WJ, Wood JM, Major D, Robertson JS, Webster RG, Katz JM (1993) Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 196: 130-137
21. Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC (1983) Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 304: 76-78
22. Vines A, Wells K, Mastrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y (1998) The role of influenza virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* 72: 7626-7631
23. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205: 17-23
24. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* 8: 189-191
25. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nerome R, Omoe K, Sugita S, Yamazaki Y, Takahashi T, Nerome K (1998) Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2)



- viruses from Japan: Evidence for genetic reassortment of the six internal genes. *J Virol* 72: 8021–8031
26. Rocha EP, Xu X, Hall HE, Allen JR, Regnery HL, Cox NJ (1993) Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *J Gen Virol* 74: 2513–2518
  27. Colman PM, Varghese JN, Laver WG (1983) Structure of the catalytic and antigenic site in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303: 41–44
  28. Li XS, Zhao CY, Gao HM, Zhang YQ, Ishida M, Kanegae Y, Endo A, Nerome R, Omoe K, Nerome K (1992) Origin and evolutionary characteristics of antigenic reassortant influenza A (H1N2) viruses isolated from man in China. *J Gen Virol* 73: 1329–1337
  29. Ito T, Suzuki Y, Mitnail L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y (1997) Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227: 493–499
  30. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152–79
  31. Manuguerra JC, Hannoun C (1999) Influenza and other viral respiratory diseases. Surveillance and laboratory diagnosis. Institut Pasteur, Paris
  32. Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ (1997) Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7712–7718
  33. Plakokefalos E, Markoulatos P, Ktenas E, Spyrou N, Vamvakopoulos NC (2000) A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A and B. *J Med Microbiol* 49: 1037–1041
  34. Phyhala R, Ikonen N, Forsten T, Alanko S, Kinnunen L (1995) Evolution of the HA1 domain of human influenza A (H1N1) virus: loss of glycosylation sites and occurrence of herald and conserved strains. *J Gen Virol* 76: 205–210
  35. World Health Organization (1996) Recommended composition of influenza vaccines for use in the 1996–1997 season. *Wkly Epidemiol Rec* 71: 57–64
  36. World Health Organization (1997) Recommended composition of influenza vaccines for use in the 1997–1998 season. *Wkly Epidemiol Rec* 72: 57–64
  37. World Health Organization (1998) Recommended composition of influenza vaccines for use in the 1998–1999 season. *Wkly Epidemiol Rec* 73: 56–65

Author's address: Dr. E. T. Plakokefalos, National Influenza Center, Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece; e-mail: eplakokefalos@mail.pasteur.gr

Received